

Zur Kenntnis der Aminoacylierungsreaktion an Alkyl-Substituierten Säurehydraziden

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Würde eines Doktors der Philosophie

vorgelegt der

Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität Basel

von

OTTO GERLE

BUDAPEST (UNGARN)

Basel 1966

Druck Fleig, Basel

**Genehmigt von der Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
auf Antrag der
Herren Professoren Dr. M. Brenner und Dr. Ch. Tamm**

Basel, den 21. Juni 1966

W. Habicht
.....

Prof. Dr. W. Habicht
Dekan

Die vorliegende Arbeit ist dem Herrn
Dr. phil. h. c. Dr. med. Dr. phil.
Dr. phil. h. c. Dr. med. Dr. phil.
Dr. phil. h. c. Dr. med. Dr. phil.

Meinen lieben Eltern
gewidmet.



Die vorliegende Arbeit ist dem Herrn
Dr. phil. h. c. Dr. med. Dr. phil.
Dr. phil. h. c. Dr. med. Dr. phil.
Dr. phil. h. c. Dr. med. Dr. phil.



Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von
Herrn Professor Dr. M. Brenner
im Institut für organische Chemie der Universität
Basel ausgeführt.

Ich danke der Schweizerischen Eidgenossenschaft,
die das Zustandekommen dieser Arbeit ermöglichte,
und Herrn Prof. Dr. M. Brenner für seine Anleitung
und seine stete Hilfsbereitschaft.

Inhaltsverzeichnis .

Seite

Abkürzungen.....	a.
Substanz-Nummerierung und Strukturformeln.....	b-f.

Theoretischer Teil

A. Einleitung.....	1
B. Ergebnisse von W. Hofer.....	3
C. Problemstellung.....	4
 I. Synthese der Ausgangsmaterialien.....	5
1. Isomere Carbonsäure-methylhydrazide durch Acylierung von Methylhydrazin.....	5
1a. N-Carbobenzoxycystein-N-methylhydrazid (1)	6
1b. Herstellung von N-Carbobenzoxycystein-N'- methylhydrazid (2)	9
2. Herstellung von N-Carbobenzoxycystein-N,N'- dimethylhydrazid (5)	10
3. Herstellung von Isobuttersäure-pyrazolidid (6) ..	11
 II. Untersuchung der Säure-Base-Eigenschaften der zwei isomeren Monomethylhydrazide.....	13
 III. 1. Die Aminoacylierung von hy-nichtsubstituier- ten Säurehydraziden mittels α -Aminosäure-N- -carboxyanhydriden.....	15
2. Umsetzung von hy-alkylierten Säurehydrazi- den mit D,L-Phenylalanin-N-carboxyanhydrid in Eisessig.....	16
3. Aminoacylierung von N-Carbobenzoxycystein-N- methylhydrazid zu N-(Carbobenzoxycysteyl)-N- methyl-N'-(D,L-phenylalanyl)-hydrazin-hydro- chlorid (7)	17

4. Herstellung von N-(Carbobenzoxycyl)-N'-methyl-N'-(D,L-phenylalanyl)-hydrazin (8) durch Aminoacylierung von N-Carbobenzoxycylglycin-N'-methylhydrazid mit D,L-Phenylalanin-N-carboxyanhydrid.....19
 5. Herstellung von N-(Carbobenzoxycyl-D,L-phenylalanin)-N,N'-dimethylhydrazid (9) aus N-Carbobenzoxycylglycin-N,N'-dimethylhydrazid (5) durch Aminoacylierung mittels D,L-Phenylalanin-N-carboxyanhydrid und anschliessende Umlagerung.....20
 6. Herstellung von Isobutyryl-D,L-phenylalanin-pyrazolidid (10) aus Isobuttersäure-pyrazolidid durch Aminoacylierung mittels D,L-phenylalanin-N-carboxyanhydrid und anschliessende Umlagerung.....24
- IV. Synthese der Vergleichsverbindungen mittels bekannter Methoden.....25

Experimenteller Teil

- I. Übersicht über einige analytische und präparative Routine-Methoden.....28
 - a.) Dünnschichtchromatographie.....28
 1. Fliessmittel.....28
 2. Nachweisreagenzien.....28
 - b.) Qualität einiger häufig verwendeter Lösungsmittel.....30
 - c.) Allgemeine Arbeitsvorschrift für Säulenchromatographie.....30
 - d.) Herstellung von D,L-Phenylalanin-N-carboxyanhydrid nach der Phosgenmethode.....31

II.	Synthese der Ausgangsmaterialien	32
1.	N-Carbobenzox glycyl-N-methylhydrazid (1) ...	32
a.)	Gemischtes Anhydrid mit Pivaloyl-chlorid.....	32
b.)	Gemischtes Anhydrid mit Chlorameisensäureäthylester.....	32
c.)	Durch Spaltung von N-(Carbobenzox glycyl)-N-methyl-N'-salicylidenhydrazin (3)	33
2.	N-Carbobenzox glycyl-N'-methylhydrazid (2) ..	34
3.	N-(Carbobenzox glycyl)-N-methyl-N'-salicylidenhydrazin (3)	34
a.)	Aus Cbzo-Glycin und Salicyliden-methylhydrazin.....	34
b.)	Aus N-Carbobenzox glycyl-N-methylhydrazid und Salicylaldehyd.....	35
4.	Salicyliden-methylhydrazin (4)	35
5.	Benzyliden-methylhydrazin (4a)	36
6.	N-(Carbobenzox glycyl)-N-methyl-N'-benzylidenhydrazin (4b)	36
a.)	Aus Cbzo-Glycin und Benzyliden-methylhydrazin.....	36
b.)	Aus N-Carbobenzox glycyl-N-methylhydrazid und Benzaldehyd.....	37

7. Verseifungsversuche von N-(Carbobenzoxyglycyl)-N-methyl-N'-benzylidenhydrazin.....	37
8. N-Carbobenzoxyglycin-N,N'-dimethylhydrazid (5)	38
9. Isobuttersäure-pyrazolidid (6)	38
III. Verschiedenes.....	39
1. Isopropyliden-methylhydrazin.....	39
2. Diacetyl-mono(N'-methyl)-hydrazon.....	39
IV. Aminoacylierungsreaktion an hy-alkylierten Säurehydraziden.....	40
1. N-(Carbobenzoxyglycyl)-N-methyl-N'-(D,L-phenylalanyl)-hydrazin-hydrochlorid (7)	40
2. N-(Carbobenzoxyglycyl)-N'-methyl-N'-(D,L-phenylalanyl)-hydrazin (8)	41
3. N-(Carbobenzoxyglycyl-D,L-phenylalanin)-N,N'-dimethylhydrazid (9)	42
4. Isobutyryl-D,L-phenylalanin-pyrazolidid (10)	42
V. Synthese der Vergleichsmaterialien.....	43
1. N-(Carbobenzoxyglycyl)-N-methyl-N'-(BOC-D,L-phenylalanyl)-hydrazin (11)	43

1a. N-(Carbobenzoxycglycyl)-N-methyl-N'-(D,L-- phenylalanyl)-hydrazin-hydrochlorid (12)	44
2. N-(Carbobenzoxycglycyl)-N'-methyl-N'-(BOC- D,L-phenylalanyl)-hydrazin (13)	44
3. N-(Carbobenzoxycglycyl)-N'-methyl-N'-(D,L- phenylalanyl)-hydrazin (14)	45
4. N-(Carbobenzoxycglycyl)-N'-(BOC-D,L-phe- nylalanyl)-N,N'-dimethylhydrazin (15)	46
5. N-(Carbobenzoxycglycyl-D,L-phenylalanin)-N,N'- dimethylhydrazid (16)	46
6. Isobutyryl-D,L-phenylalanin (17)	47
7. Isobutyryl-D,L-phenylalanin-cyanmethyles- ter (18)	48
8. Isobutyryl-D,L-phenylalanin-pyrazolidid (19) ..	48
9. N-(Carbobenzoxy-D,L-phenylalanin)-N'-iso- butyryl-pyrazolidin (20)	49

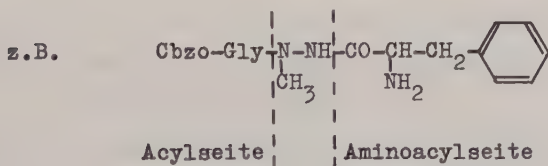
VI. Potentiometrische Titration zur Bestimmung von Dissoziationskonstanten.....	49
a.) Durchführung.....	49
b.) Messergebnisse.....	50
c.) Zur Berechnung der Dissoziationskonstanten....	51
Zusammenfassung.....	52
Literaturverzeichnis.....	54
Curriculum vitae.....	55

T H E O R E T I S C H E R T E I L .

Abkürzungen.

In der vorliegenden Arbeit werden folgende Abkürzungen verwendet:

Cbzo-	=	Carbobenzoxy-
Bzo-	=	Benzoyl-
BOC-	=	tert.-Butyloxycarbonyl-
Ac-	=	Acetyl-
D,L-Phe-CO ₂	=	D,L-Phenylalanin-N-carboxyanhydrid
-OCH ₂ CN	=	-cyanmethylester
D.F.A.	=	Dimethylformamid
hy-alkyliert	=	allgemein am Hydrazin-Stickstoff alkyliert
hy-N-alkyliert	=	Hydrazin-Stickstoff an Acylseite alkyliert
hy-N'-alkyliert	=	Hydrazin-Stickstoff an Aminoacyl- seite alkyliert
hy _{N,N'} -alkyliert	=	beide Hydrazin-Stickstoffe alky- liert

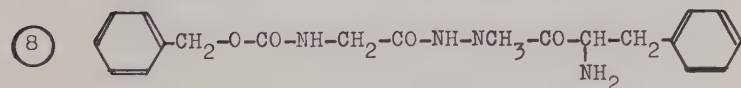
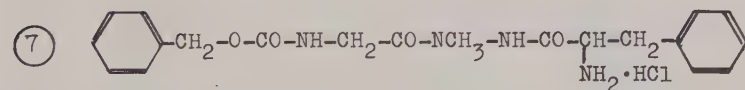
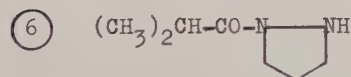
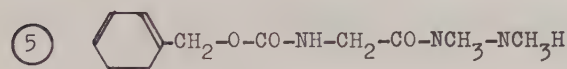
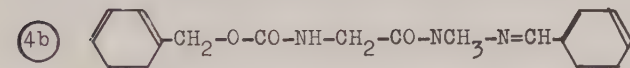
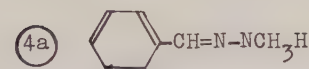
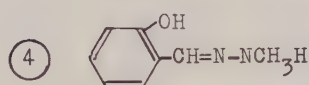
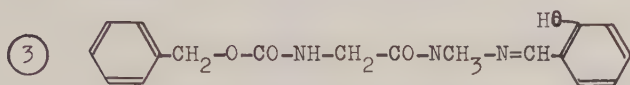
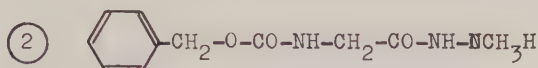
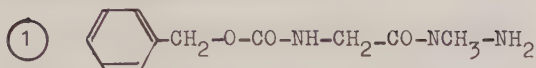


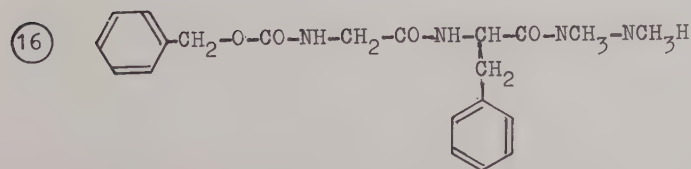
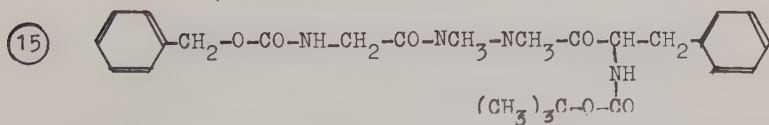
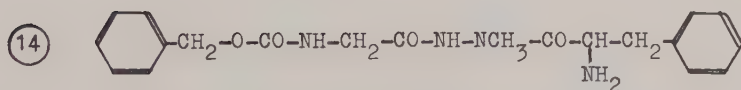
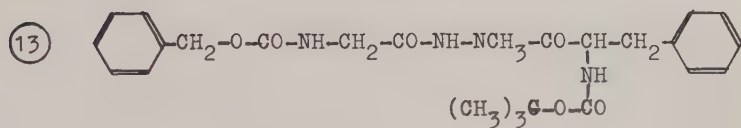
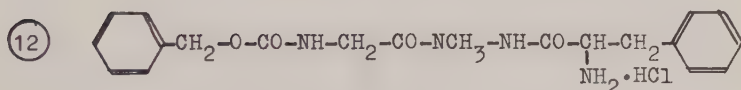
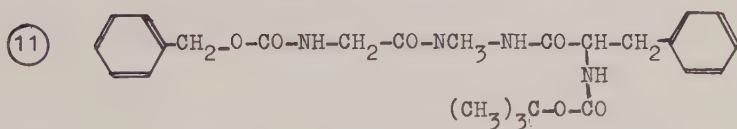
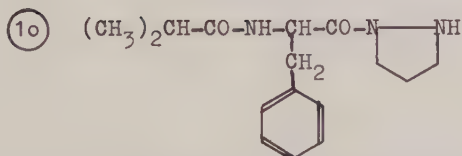
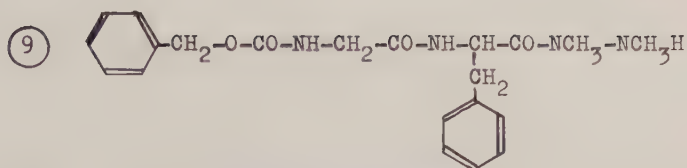
Das obige Beispiel zeigt eine hy-N-alkylierte Verbindung.

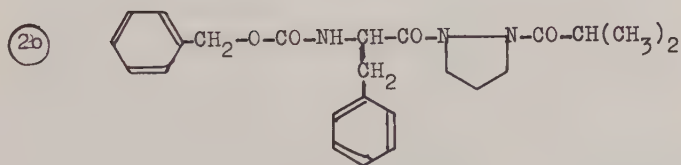
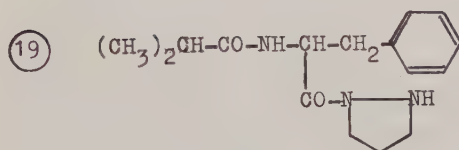
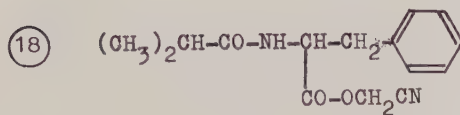
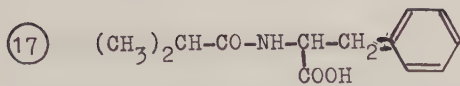
Substanz-Nummerierung

- ① N-Carbobenzoxyglycin-N-methylhydrazid
- ② N-Carbobenzoxyglycin-N'-methylhydrazid
- ③ N-(Carbobenzoxyglycyl)-N-methyl-N'-salicylidenhydrazin
- ④ Salicyliden-methylhydrazin
- ④a Benzyliden-methylhydrazin
- ④b N-(Carbobenzoxyglycyl)-N-methyl-N'-benzylidenhydrazin
- ⑤ N-Carbobenzoxyglycin-N,N'-dimethylhydrazid
- ⑥ Isobuttersäure-pyrazolidid
- ⑦ N-(Carbobenzoxyglycyl)-N-methyl-N'-(D,L-phenylalanyl)hydrazin-hydrochlorid
- ⑧ N-(Carbobenzoxyglycyl)-N'-methyl-N'-(D,L-phenylalanyl)hydrazin
- ⑨ N-(Carbobenzoxyglycyl-D,L-phenylalanyl)-N,N'-dimethylhydrazin
- ⑩ Isobutyryl-D,L-phenylalanin-pyrazolidid
- ⑪ N-(Carbobenzoxyglycyl)-N-methyl-N'-(BOC-D,L-phenylalanyl)-hydrazin
- ⑫ N-(Carbobenzoxyglycyl)-N-methyl-N'-(D,L-phenylalanyl)-hydrazin-hydrochlorid
- ⑬ N-(Carbobenzoxyglycyl)-N'-methyl-N'-(BOC-D,L-phenylalanyl)-hydrazin
- ⑭ N-(Carbobenzoxyglycyl)-N'-methyl-N'-(D,L-phenylalanyl)-hydrazin
- ⑮ N-(Carbobenzoxyglycyl)-N'-(BOC-D,L-phenylalanyl)-N,N'-dimethylhydrazin

- ①6 N-(Carbobenzoxycyl-D,L-phenylalanin)-N,N'-dimethyl-hydrazid
- ①7 Isobutyryl-D,L-phenylalanin
- ①8 Isobutyryl-D,L-phenylalanin-cyanmethylester
- ①9 Isobutyryl-D,L-phenylalanin-pyrazolidid
- ②0 N-(Carbobenzoxy-D,L-phenylalanyl)-N'-isobutyryl-pyrazolidin

Substanz-Nummerierung.





A. Einleitung

Bei allen klassischen Methoden zur Peptidsynthese findet man das gleiche Grundprinzip, nämlich das Curtius-Fischer'sche Prinzip der intermolekularen Kondensation endständiger Carboxyl und Aminogruppen. Hier muss eine der beiden Komponenten einen aktivierenden Substituenten enthalten, während alle anderen funktionellen Gruppen durch reversible Schutzgruppen temporär geschützt sein müssen.

Brenner et al.¹⁻⁴⁾ erkannten ein neues Syntheseprinzip, bei dem die ins Peptid einzuführende Aminosäure carboxylendständig an einen Akzeptor gebunden wird, welcher selbst ein Bestandteil des geschützten Peptides ist. Das Syntheseprinzip ist in Schema 1 dargestellt. (Seite 2)

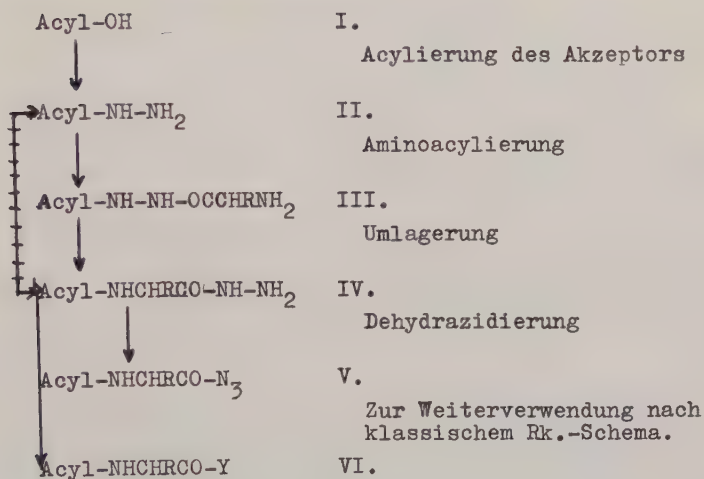
Der Übergang von III. zu IV. in Schema 1 wurde als Aminodiacylhydrazin-Umlagerung bezeichnet.

Der von W. Hofer⁵⁾ in seiner Dissertation beschriebene Reaktionszyklus für das Aminoacyleinlagerungsprinzip kann nur dann präparativ angewendet werden, wenn die folgenden Voraussetzungen ganz oder wenigstens teilweise erfüllt sind:

1. Das Ausgangsmaterial mit dem eingebauten Akzeptor muss leicht zugänglich sein.
2. Die Einführung der Aminosäure (Aminoacylierung) in den Akzeptor muss ohne störende Nebenreaktionen verlaufen; es muss insbesondere ein zu frühes Einsetzen der Umlagerungsreaktion verhindert werden können.
3. Die Umlagerungsbedingungen müssen Nebenreaktionen ausschliessen.

4. Der Akzeptor darf im Endprodukt der Synthese nicht stören, muss also zum Beispiel, wenn nötig, leicht abspaltbar sein.

Schema 1. Die Hydrazidgruppe als Akzeptor bei der Peptidsynthese nach dem Aminoacyl-Einlagerungsprinzip.



Y = OH-Gruppe oder aktivierende Gruppe

→ neuer Reaktionszyklus

Inwieweit die oben genannten Bedingungen in Bezug auf die Aminoacylierungsreaktion - II. → III.

(Seite 2) erfüllt werden können, wird im nächsten Abschnitt besprochen werden.

B. Ergebnisse von W. Hofer⁵⁾

Die Reaktion II. $\rightarrow$ III. (S. 2) lässt sich mittels der bekannten Verfahren wohl durchführen, jedoch sind die Ausbeuten dabei nicht befriedigend. Zudem kompliziert der generell erforderliche temporäre Schutz der α -Aminogruppe den Syntheseverlauf.

W. Hofer fand eine bessere Möglichkeit, die Aminoacylgruppe in das Säurehydrazid einzuführen. Seine Untersuchungen zeigen, dass die Umsetzung zwischen äquimolaren Mengen von Säurehydrazid und α -Aminosäure-N-carboxyanhydriden in Eisessig bei Zimmertemperatur innerhalb von 5 Minuten praktisch quantitativ verläuft. Der Schutz der α -Aminogruppe durch den Eisessig ist nicht absolut, jedoch können dank des raschen und quantitativen Umsatzes von Säurehydrazid und α -Aminosäure-N-carboxyanhydrid die viel langsamer ablaufenden Sekundärreaktionen (Acetylierung, Polymerisation) verhindert werden.

Ein unerwünschtes Einsetzen der Umlagerung nach der Aminoacylierung kann durch Zusatz einer starken Säure (HCl, F_3CCOOH) verhindert werden. Diese Methode ermöglicht die einfache Realisierung von Schritt II. $\rightarrow$ III. (S. 2) und so kann man die auf diese Weise hergestellten α -Aminodiacylhydrazine in Verbindung mit der Amino-diacylhydrazinumlagerung III. $\rightarrow$ IV. (S. 2) als brauchbare Ausgangsmaterialien für die Peptidsynthese verwenden.

Die kinetische Untersuchung verschiedener Umlagerungsreaktionen ergab jedoch grosse Unterschiede in der Reaktionsgeschwindigkeit in bezug auf die Abhängigkeit vom Reaktionsmilieu und die Struktur des α -Aminodiacylhydrazins. Gewisse α -Aminodiacylhydrazine zeigten eine derart langsame Reaktionsgeschwindigkeit, dass die Umlagerung nicht zur Herstellung der betreffenden Sequenz geeignet ist.

Da die Struktur des α -Aminodiacylhydrazins starken Einfluss auf die Reaktionsgeschwindigkeit ausübt, kann nicht jedes beliebige Dipeptid mit Hilfe der Aminodiacylhydrazinumlagerung hergestellt werden. Solange die Bedingung 3. (S. 1) nicht in jedem Falle erfüllbar ist, kann das Aminodiacylhydrazinumlagerungsverfahren der Peptidsynthese nach klassischem Prinzip nicht ebenbürtig zur Seite gestellt werden.

W. Hofer^{x)} untersuchte ferner die Umlagerungsfähigkeit von hy-N-, hy-N'- und hy-N,N'-alkylierten α -Aminodiacylhydrazinen und fand, dass diese teilweise höhere Umlagerungsgeschwindigkeiten als die an hy nicht alkylierten α -Aminodiacylhydrazine aufwiesen.

Im Rahmen dieser Arbeiten stellte W. Hofer aber auch fest, dass sich der glatte Verlauf der Aminoacylierungsreaktion in Eisessig mittels α -Aminosäure-N-carboxyanhydriden auf nicht alkylierte Säurehydrazide beschränkt.

C. Problemstellung

Da die an hy-Stickstoff alkylierten α -Aminodiacylhydrazine, wie erwähnt, günstigere Umlagerungsgeschwindigkeiten besitzen, war es von Interesse, die Aminoacylierung derselben mit α -Aminosäure-N-carboxyanhydriden näher zu untersuchen.

Diese Arbeit befasst sich mit der Herstellung von an hy-Stickstoff substituierten Säurehydraziden und deren Aminoacylierung mittels D,L-Phenylalanin-N-carboxyanhydrid.

I. Synthese der Ausgangsmaterialien.

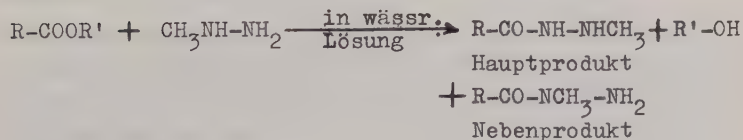
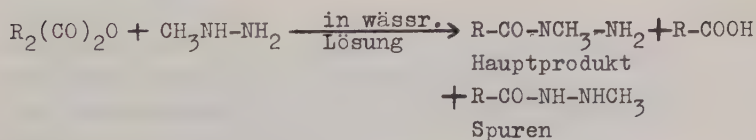
Als Ausgangsmaterialien dienten folgende Verbindungen:

- 1a.) N-Carbobenzox glycylglycin-N-methylhydrazid (1)
- 1b.) N-Carbobenzox glycylglycin-N'-methylhydrazid (2)
2. N-Carbobenzox glycylglycin-N,N'-dimethylhydrazid (5)
3. Isobuttersäure-pyrazolidid (6)

1. Isomere Carbonsäure-methylhydrazide durch Acylierung von Methylhydrazin.

Bei der Synthese monosubstituierter Hydrazide können prinzipiell zwei Isomere entstehen. R.L. Hinman & D. Fulton⁶⁾ fanden, dass bei der Umsetzung des Monomethylhydrazins mit Säureanhydriden in wässriger Lösung das N-Acyl-N-methylhydrazin als Hauptprodukt nebst Spuren des N-Acyl-N'-methyl-Isomeren entsteht. Wenn man statt Anhydride Carbonsäureester verwendet, erhält man hauptsächlich das N-Acyl-N'-methyl-Isomere neben geringen Mengen des N,N-disubstituierten Produkts. (Siehe Schema 2)

Schema 2 Acylierung von Methylhydrazin in wässriger Lösung.



Zur Isomerentrennung kann man, wie unten beschrieben wird, von dem Umstand Gebrauch machen, dass nur das

Methylhydrazid mit endständiger $-NH_2$ Gruppe ein Hydrazon geben kann, dass solche Hydrazone durch Kristallisation oder Chromatographie trennbar sind und dass sie unter Umständen (Salicylaldehyd-Hydrazon) leicht spaltbar sind.

Da der Reinigungsschritt über das Hydrazon obligatorisch ist, lässt sich bei der Synthese von (1) auch daran denken, das Hydrazon durch Acylierung von N-methyl-salicylidenhidrazin zu gewinnen.

Im folgenden werden die entsprechenden Synthesenwege beschrieben.

1a.) N-Carbobenzoxylglycin-N-methylhydrazid (1)

1. Weg: Man verknüpfte Carbobenzoxylglycin und Methylhydrazin nach der gem. Anhydrid-Methode⁸⁾

α) mit Pivaloylchlorid in abs. Chloroform⁷⁾

β) mit Chlorameisensäureäthylester in abs. Chloroform⁸⁾

γ) mit Chlorameisensäureäthylester in wässr. Lösung.

In allen Fällen entstanden nebeneinander (1) und (2) ; als Nebenprodukt bildete sich nach α) Pivalinsäure-N-methylhydrazid.

Die Ausbeuten an (1) + (2) -Gemisch betrugen nach α) 35,9 %, nach β) 84 % und nach γ) 38,4 %.

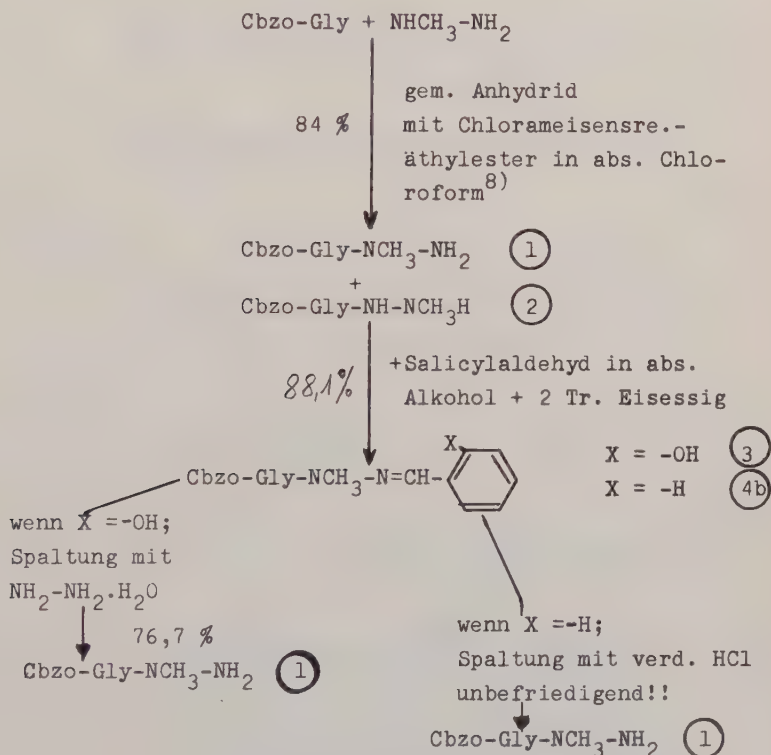
Das Substanzverhältnis (1) zu (2) nach β) betrug ungefähr 90:10 und nach γ) 100:1.

Zur Isolierung von (1) wurde das Produkt aus Reaktion β) in abs. Alkohol mit Salicylaldehyd und 2 Tropfen Eisessig als Katalysator behandelt, worauf sich (1) in Form seines Salicylidenderivates (3) in kristalliner Form abschied.

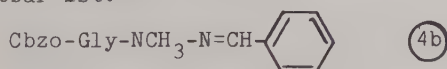
Das Umkristallisieren von (3) aus abs. Alkohol und die

nachfolgende Spaltung mit Hydrazinhydrat in abs. Alkohol lieferte reines (1) vom Smp. 73-74°. Ausbeute: 76,7 %. Der Syntheseweg von (1) ergibt sich also aus folgendem Schema.

Schema 3



Das Ersetzen von Salicylaldehyd durch Benzaldehyd ist unbefriedigend, weil das Benzylidenderivat (4b) schlecht spaltbar ist.

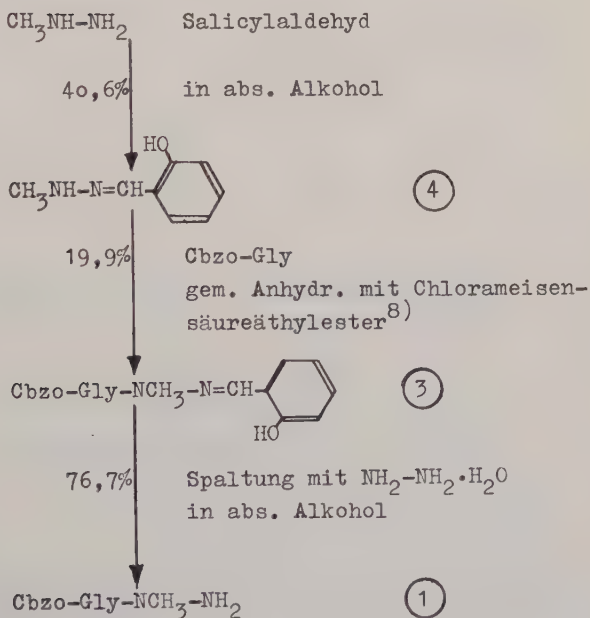


2. Weg: Man synthetisierte das N-methyl-hydrazon (Salicyliden und Benzyliden) aus Methylhydrazin und Aldehyd (Salicyl- und Benzaldehyd), acylierte den hy-Stickstoff mit Carbobenzoxyglycin mittels gem. Anhydridmethode⁸⁾ und spaltete das Hydrazon um das Hydrazid zu erhalten.

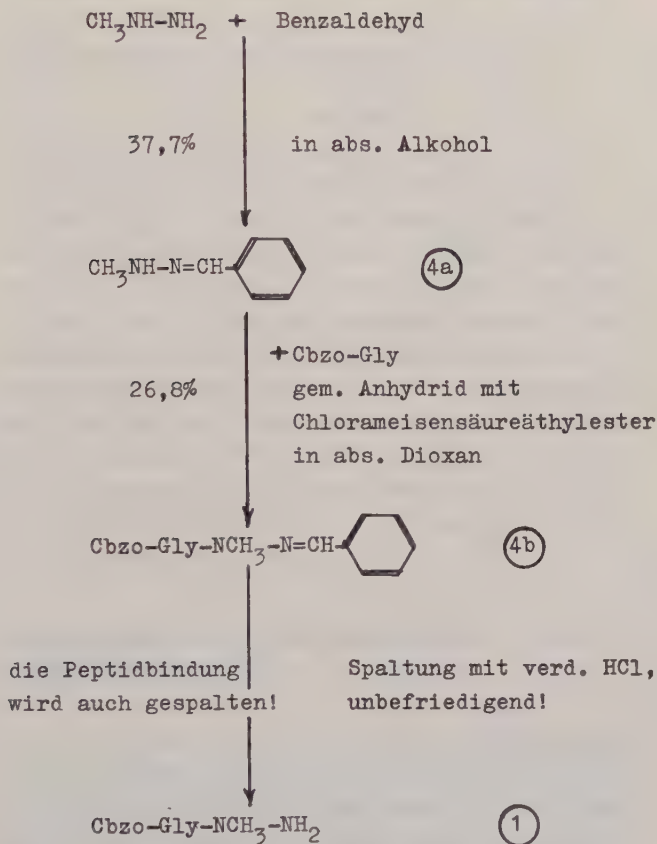
Diese Wege waren wegen der zu kleinen Ausbeuten nicht ausbaufähig. (Näheres vgl. exp. Teil)

Die durchgeführten Synthesen sind in nachfolgendem Schema dargestellt.

Schema 4



Schema 4 Fortsetzung



1b.) Herstellung von N-Carbobenzoxglycin-N'-methylhydrazid (2).

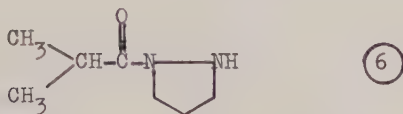
Die Herstellung von (2) bereitete wesentlich weniger Schwierigkeiten als diejenige von (1). Die Synthese erfolgte aus Carbobenzoxglycincyanmethylester und Methylhydrazin.

Wegen seiner grösseren Reaktionsfähigkeit wurde der aktivierte Ester dem einfachen Methylester vorgezogen. Die unter Hydrazinolyse-Bedingungen verlaufende Reaktion lieferte ein geringfügig mit N,N-disubstituiertem Produkt verunreinigtes Hydrazid in 79%-iger Ausbeute, das aber noch gereinigt werden musste. Hier nahm man wiederum die Eigenschaft von (1), mit Ketonen Hydrazone zu bilden, zu Hilfe. Das Rohprodukt wurde in einer überschüssigen Menge Aceton gelöst, 30 Minuten unter Rückfluss gekocht und nach Einengen auf ca. 4-5 ml auf einer Säule mit Kieselgelfüllung chromatographiert. Die anfallenden Fraktionen wurden dünnschichtchromatographisch ausgewertet. Die Trennung von (2) und der Isopropyliden-Verbindung von (1) erfolgte einwandfrei. Nach der Trennung erhielt man das Hydrazid (2) in reiner, kristalliner Form vom Schmelzpunkt 93-94° in 68%-iger Ausbeute (auf das Carbobenzoxylglycin bezogen).

2. Herstellung von N-Carbobenzoxylglycin-N,N'-dimethyl-hydrazid (5) .

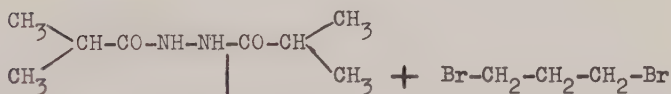
Als Ausgangsmaterial dienten sym.-Dimethylhydrazin und Carbobenzoxylglycin-cyanmethylester. Die Hydrazinolyse wurde in Essigester mit drei Tropfen Eisessigzusatz bei Zimmertemperatur ausgeführt. Das erhaltene Öl widerstand jedem Kristallisationsversuch, war jedoch chromatographisch rein; Ausbeute: 63%.

3. Herstellung von Isobuttersäure-pyrazolidid (6)



Als Ausgangsmaterial zur Herstellung diente das N,N'-Diisobutyryl-pyrazolidin, welches nach der Vorschrift von Stetter⁹⁾ synthetisiert wurde.

Schema 5



NaOET in D.F.A.
bei 120°



part. Hydrolyse in 96% EtOH
mit NaOH bei 100°, 7 Stunden.



Bei der Herstellung von Diisobutyryl-pyrazolidin wurde abweichend von der Literaturangabe⁹⁾ Natriumäthylat statt Kaliumäthylat verwendet, das aber durchaus gleiche Ausbeuten lieferte.

Das Isobuttersäure-pyrazolidid wurde durch Partialverseifung des Diisobutyryl-pyrazolidins mit Natriumhydroxyd in 96-proz. Äthanol in guter Ausbeute (76 %) erhalten. Der Siedepunkt betrug 88-90° bei 0,1 Torr.

II. Untersuchung der Säure-Base-Eigenschaften der zwei isomeren Monomethylhydrazide.

Die Aminoacylierungsreaktion läuft in saurem Milieu ab. Aus diesem Grunde war es von grosser Wichtigkeit, über die Protonierbarkeit von (1) und (2) nähere Auskünfte zu erhalten. In Tabelle 1 sind die Dissoziationskonstanten der zwei isomeren Methylhydrazide und verwandter Verbindungen aufgeführt.

Tabelle 1 Scheinbare Dissoziationskonstanten substituierter und unsubstituierter Säurehydrazide bei 24[±]1°.

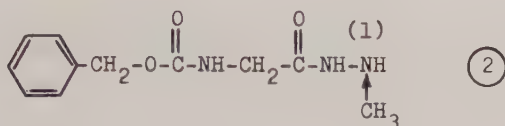
No.	Substanz	pK'_A	Lit.
1	Cbzo-Gly-NCH ₃ -NH ₂ (1)	1,78	
2	Cbzo-Gly-NH-NCH ₃ H (2)	3,09	
3	Cbzo-Gly-NH-NH ₂	2,75	5)
4	Bzo-NH-NH ₂	2,97	5)
5	Ac-NH-NH ₂	3,24	10)

Der geschätzte mittlere Fehler, der im Rahmen dieser Arbeit bestimmten pK'_A -Werte beträgt [±]0,1 pK-Einheiten.

Die pK'_A -Bestimmungen erfolgten durch Auswertung potentiometrischer Titrations der Verbindungen. Die Angaben über diese Titrations und über die Berechnung der pK'_A -Werte befinden sich im experimentellen Teil dieser Arbeit.

(1) ist rund zehnmal weniger basisch als das entsprechende Carbobenzoxycystein-hydrazid. Dieser

Basizitätsabfall kann nicht strukturell erklärt werden. Es scheint, dass die sterischen Aspekte bestimmend sind. Um exakte Aussagen machen zu können, sind noch weitere Untersuchungen erforderlich, die nicht im Rahmen dieser Arbeit gemacht werden. Bei (2) ist die Rolle der CH_3 -Gruppe wesentlich.



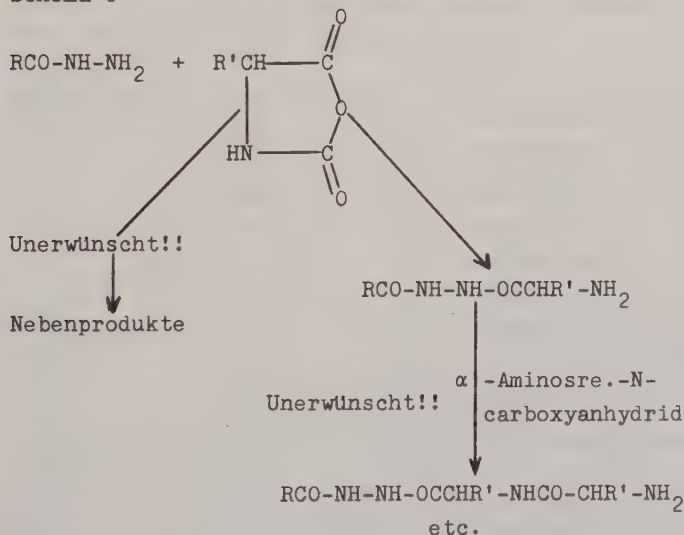
Die Methylgruppe vergrößert durch ihren + induktiven Effekt die Elektronendichte am Stickstoffatom (1), was wiederum die erhöhte Basizität im Vergleich mit dem Carbobenzoxylglycin-hydrazid erklärt.

Ueber den Reaktivitätsunterschied zwischen (1) und (2) sollte man nicht vor Kenntnis der sterischen Verhältnisse aussagen.

III. 1. Die Aminoacylierung von hy-nichtsubstituierten Säurehydraziden mittels α -Aminosäure-N-carboxyanhydriden.

Bei der Reaktion zwischen einem α -Aminosäure-N-carboxyanhydrid und einem Säurehydrazid ist es ein wichtiges Kriterium, dass einerseits die entstehenden freien α -Aminogruppen nicht mit unverbrauchtem N-Carboxyanhydrid reagieren (Bildung von Polymerisationsprodukten) und andererseits das N-Carboxyanhydrid so rasch mit dem Hydrazid abreagiert, dass keine Zeit für Nebenreaktionen mit dem Lösungsmittel bleibt.

Schema 6



Ein glatter Reaktionsverlauf nach Schema 6 wird nach W. Hofer⁵⁾ bei den Aminodiacylhydrazinen beobachtet, die am hy-Stickstoff nicht alkyliert sind.

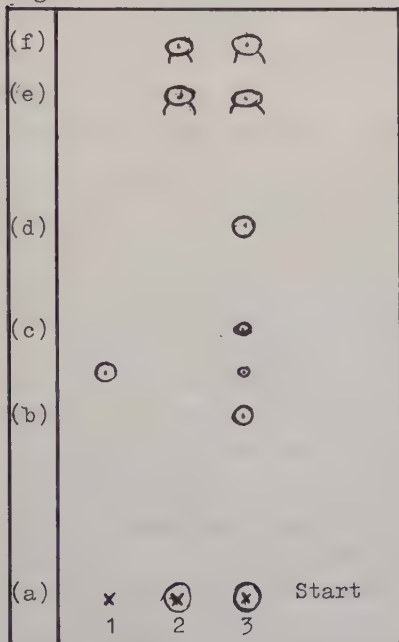
Im nächsten Abschnitt wird über die Aminoacylierung von hy-alkylierten Säurehydraziden berichtet.

2. Umsetzung von hy-alkylierten Säurehydraziden mit D,L-Phenylalanin-N-carboxyanhydrid in Eisessig.

Die Aminoacylierungsreaktion der hy-alkylierten Säurehydrazide mit D,L-Phe-CO₂ in Eisessig verläuft, wie auch W. Hofer⁵⁾ feststellte, nicht so glatt wie bei den einfachen Säurehydraziden (mit Ausnahme von (2)).

Der Schutz der α-Aminogruppe durch den Eisessig⁵⁾ bei der Umsetzung ist nicht absolut. Somit können die nicht geschützten α-Aminogruppen zu Sekundärreaktionen Anlass geben. Zur Veranschaulichung der Sekundärreaktionen dient das in Figur 1 dargestellte Dünnschichtchromatogramm des Produktes aus äquimolaren Mengen von N-Carbobenzoxycglycin-N-methylhydrazid (1) und D,L-Phe-CO₂.

Figur 1



1. Cbzo-Gly-NCH₃-NH₂ (1)
in Eisessig.

2. D,L-Phe-CO₂ in Eisessig.

3. Äquimolares Verhältnis von Cbzo-Gly-NCH₃-NH₂ (1) und D,L-Phe-CO₂ in Eisessig.

(b)= primäres Produkt (7)
D,L-Phe-
Cbzo-Gly-NCH₃-NH-

(a),(e),(f)= Zersetzungsprodukte des D,L-Phe-CO₂

(c),(d)= Produkte aus Umsetzung des primär gebildeten (7) mit noch vorhandenem D,L-Phe-CO₂.

Zum wirksameren Schutz der α -Aminogruppe erschien es nun naheliegend, die Reaktion in stärker saurem Milieu durchzuführen und dabei, wie W. Hofer⁵⁾ in seiner Dissertation schreibt, eine Verlangsamung der Reaktion durch stärkere Protonierung der hy-Gruppe in Kauf zu nehmen.

3. Aminoacylierung von N-Carbobenzoxycglycin-N-methylhydrazid zu N-(Carbobenzoxycglycyl)-N-methyl-N'-(D,L-phenylalanyl)-hydrazin-hydrochlorid. (7)

Das für die erfolgreiche Umsetzung postulierte stärker saure Milieu war mit Halogenessigsäure-Zusätzen erreichbar. Um eine Abstufung des Milieus zu erreichen, wählte man die folgenden Halogenessigsäuren:

Säure	ClCH_2COOH	Cl_2CHCOOH	Cl_3CCOOH	F_3CCOOH
$K_A(\text{H}_2\text{O})20^\circ$	$1,4 \cdot 10^{-3}$	$5 \cdot 10^{-2}$	$1 \cdot 10^{-1}$	vollst. dissoziiert

Es war wichtig zu beachten, dass bei zu saurem Reaktionsmedium die Hydrazidgruppe ebenfalls protoniert werden kann, was eine Blockierung derselben bedeuten würde. Zur Abklärung der sich zunächst stellenden Frage nach den günstigsten Reaktionsbedingungen für die Aminoacylierungsreaktion wurde (1) den in Tabelle 2 (S. 18) aufgeführten Bedingungen ausgesetzt. 23,7 mg (0,1 mMol) des Hydrazides wurden in 1 ml Eisessig gelöst und der entsprechende Zusatz an Halogenessigsäure zugefügt. Nach Vorwärmen auf die jeweils angegebene Temperatur (25° = Zimmertemperatur) fügte man die äquimolare Menge, 19,1 mg (0,1 mMol), D,L-Phenylalanin-N-carboxyanhydrid zu und untersuchte das Gemisch chromatographisch nach beendeter, gewählter Reaktionszeit.

Tabelle 2 Qualitative chromatographische Untersuchung des Reaktionsgemisches der Aminoacylierung von N-Carbobenzoxycglycin-N-methylhydrazid bei verschiedenen Halogenessigsäure-Zusätzen.

No.	Zusätze	Reaktionsbedingungen		chromatographische Analyse		
		Temp. °C	Zeit in Minuten	A	P	N
1	1 Aq. ClCH ₂ COOH	25	5	++	(+)	++
2	" Cl ₂ CHCOOH	"	"	++	-	++
3	" Cl ₃ CCOOH	"	"	++	-	++
4	" F ₃ CCOOH	"	"	++	-	++
5	10 " ClCH ₂ COOH	"	"	+	+	+(+)
6	" Cl ₂ CHCOOH	"	"	+	+	++
7	" Cl ₃ CCOOH	"	"	+	+	++
8	" F ₃ CCOOH	"	"	+	+	++
9	100 " ClCH ₂ COOH	"	"	+	+	(+)
10	" Cl ₂ CHCOOH	"	"	+	+	++
11	" Cl ₃ CCOOH	"	"	+	+	++
12	" F ₃ CCOOH	"	"	+	+	++
13	100 " ClCH ₂ COOH	40	30	(+)	+	(+)
14	" "	60	15	(+)	+	(+)
15	" "	80	15	-	++	(+)
16	" "	80	30	-	++	(+)
17	20 " "	80	15	-	++	Spur.

Aufsteigende Dünnschichtchromatographie auf Kieselgel-G nach Stahl¹²⁾

Chloroform/Isopropanol 10:1 (v/v) als Fließmittel.

A = Ausgangsmaterial (1) P = primäres Produkt (7)

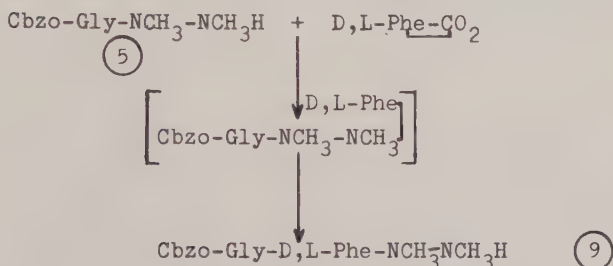
N = Nebenprodukte

Aus den in Tabelle 2 aufgeführten Ergebnissen der qualitativen chromatographischen Analyse ist ersichtlich, dass die günstigsten Reaktionsbedingungen bei No. 15, 16 und 17 anzutreffen sind. Die Aminoacylierungsreaktion unsubstituierter Säurehydrazide verläuft normalerweise glatt in 5 Minuten. Die Reaktion bei hy-substituierten Säurehydraziden bedingt ein stärker saures Milieu. Dadurch verlangsamt sich die Umsatzgeschwindigkeit. So waren 15 Minuten Reaktionszeit bei 80° nötig, um das Ausgangsmaterial im Dünnschichtchromatogramm zum Verschwinden zu bringen. Nach dieser Zeit schreckte man das Reaktionsgemisch ab und versetzte es mit 3 Vol.-Teilen trockenem HCl-gesättigtem Essigester. Nach 1-bis 2-minütigem Stehen wurde die Lösung am Vacuum zur Trockene eingeeengt. Dies wiederholte man ohne HCl drei- bis viermal und setzte den Rückstand zur Hochvacuumsublimation an. Nach Absublimieren der Monochloressigsäure blieb das N-(Carbobenzoxglycyl)-N-methyl-N'-(D,L-phenylalanyl)-hydrazin in Form von Hydrochlorid vom Schmelzpunkt 191-197° zurück. Die Ausbeute betrug 43,8%, ist aber zu klein.

4. Herstellung von N-(Carbobenzoxglycyl)-N'-methyl-N'-(D,L-phenylalanyl)-hydrazin (8) durch Aminoacylierung von N-Carbobenzoxglycin-N'-methylhydrazid mit D,L-Phenylalanin-N-carboxyanhydrid.

Wie bereits erwähnt (S.16), bildet die Aminoacylierungsreaktion von (2) mittels D,L-Phenylalanin-N-carboxyanhydrid eine Ausnahme. Die Reaktion verläuft in Eisessig innerhalb von 10 Minuten praktisch vollständig. Nach Verarbeitung erhält man (8) als reines Produkt vom Smp. 143-145° mit 62,6% Ausbeute (Näheres im prakt. Teil). Die Analyse, die physikalischen Daten und das chromatographische Verhalten der Substanz stimmten mit denjenigen des authentischen Vergleichsmaterials überein.

5. Herstellung von N-(Carbobenzoxycyl-D,L-phenylalanin)-N,N'-dimethylhydrazid (9) aus N-Carbobenzoxycylglycin-N,N'-dimethylhydrazid (5) durch Aminoacylierung mittels D,L-Phenylalanin-N-carboxyanhydrid und anschliessende Umlagerung.



Wie die Vorversuche zeigten, reagiert das N-Carbobenzoxycylglycin-N,N'-dimethylhydrazid (5) in Eisessig mit N-Carboxyanhydrid unter reichlicher Bildung von Nebenprodukten. Um die günstigsten Reaktionsbedingungen zu finden, wurden Versuche mit verschiedenen Halogenessigsäure-Zusätzen angesetzt, die aus Tabelle 3 ersichtlich sind (S. 21).

Die günstigsten Bedingungen wiesen 4 und 5 auf. Bei 5 war die Reaktion nach 2 Stunden beendet. Es sei vermerkt, dass die Reaktion trotz überschüssiger Menge D,L-Phenylalanin-N-carboxyanhydrid (2 Aq. zu 1 Aq. (5)) relativ einheitlich verlief.

Nach anschliessender spontaner Umlagerung des rohen nach Versuch No. 5 (Tab. 3) erhaltenen Produktes in Essigester konnte man direkt das Hydrazid (9) vom Smp. 134-136° in einer Ausbeute von 60,8 % isolieren.

Das N-(Carbobenzoxycyl)-N,N'-dimethyl-N'-(D,L-phenylalanyl)-hydrazin ergab bei der dünnschichtchromatographischen Untersuchung zwei gleich starke Ninhydrin-positive Flecken.

Tabelle 3 Qualitative chromatographische Untersuchung der Aminoacylierungsreaktion von (5) mit D,L-Phenylalanin-N-carboxyanhydrid.

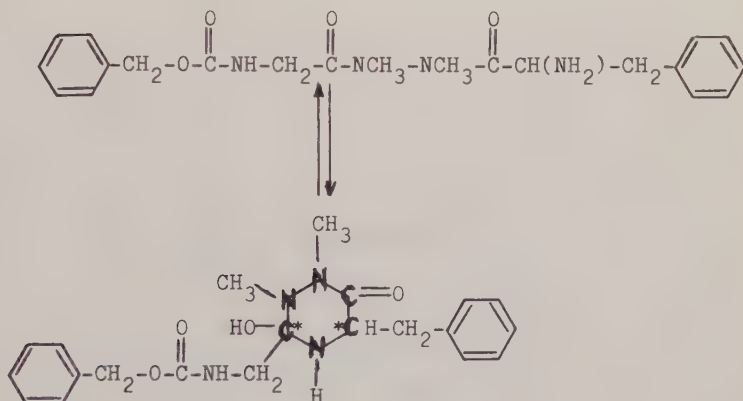
No.	mMol (5)	mMol NCA	Zu- sätze	Eis- essig ml	Temp. °C	chromatogr. Analyse*					
						nach 5 Min.			nach 60 Min.		
						A	P	N	A	P	N
1	0,1	0,1	100 Aq. Cl ₂ CHCOOH	1	25	-	(+)	++	-	(+)	++
2	0,1	0,1	100 Aq. Cl ₃ CCOOH	1	25	-	+	++	-	+	++
3	0,1	0,1	100 Aq. F ₃ CCOOH	1	25	-	++	++	-	++	++
4	0,1	0,2	0,3 mMol F ₃ CCOOH	1	25	-	+++	+	-	+++	+
5	4,5	9,0	13,4 mMol F ₃ CCOOH	45	60	-	+++	(+)	-	+++	(+)

* Aufsteigende Dünnschichtchromatographie auf Kieselgel-G nach Stahl¹²⁾. Chloroform/Isopropanol 2:1 (v/v) als Fliessmittel. NCA = D,L-Phe-GO₂
A = Ausgangsmaterial = (5); P = primäres Produkt; N = Nebenprodukte

Wenn man diese Flecken auskratzt und mit dem gleichen Fliessmittel rechromatographiert, erscheinen auf dem neuen Chromatogramm die den ausgekratzen Zonen entsprechenden Flecken wieder. Die Intensität der beiden Flecken nach Rechromatographieren ist, wenn es sofort nach dem Auskratzen ausgeführt wird, nicht gleich. Wenn man das ausgekratzte Kieselgel in einem Lösungsmittel (z.B. Essigester) stehen lässt und erst nach 2 bis 3 Stunden rechromatographiert, so zeigen die beiden Flecken wieder die gleiche Intensität. Dies deutet auf ein Gleichgewicht zwischen den beiden Flecken hin. Die Flecken sind übereinander angeordnet und mit einem verwaschenen Ninhydrin-positiven Schweif verbunden. Die Lage der Flecken ist in Figur 2 dargestellt (S. 23).

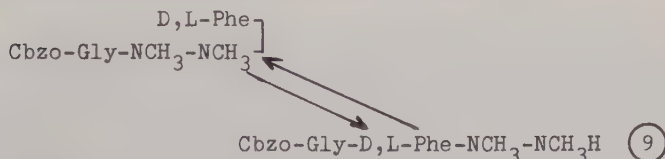
Anhand dieses Befundes sollte man annehmen, dass N-(Carbobenzoxylglycyl)-N,N'-dimethyl-N'-(D,L-phenylalanyl)-hydrazin in zwei isomeren Formen existiert. Die beiden Isomere können nicht durch fraktionierte Kristallisation getrennt werden. Im vorliegenden Fall können die folgenden Ueberlegungen angestellt werden:

1. Es liegt ein Gleichgewicht zwischen der offenkettigen und der Ringform vor.



* = asymmetrisches Zentrum

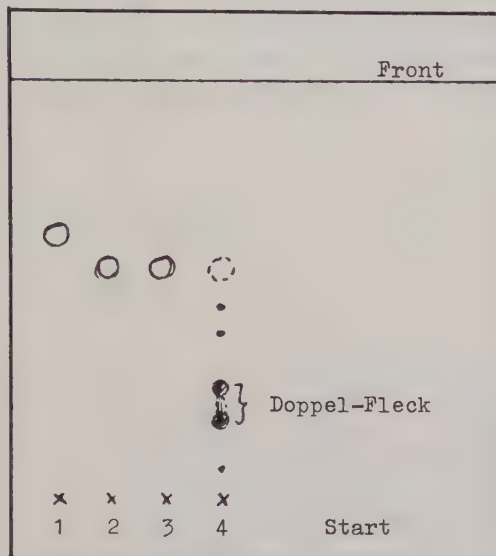
2. Es besteht ein Gleichgewicht zwischen dem Diacylhydrazin und seinem Umlagerungsprodukt.



3. Es könnte sich bei den Flecken um die möglichen Diastereoisomeren der Ringform handeln.

Figur 2

Dünnschichtchromatographie auf Kieselgel-G nach Stahl¹²⁾
Chloroform/Isopropanol 10:1 (v/v) als Fließmittel.



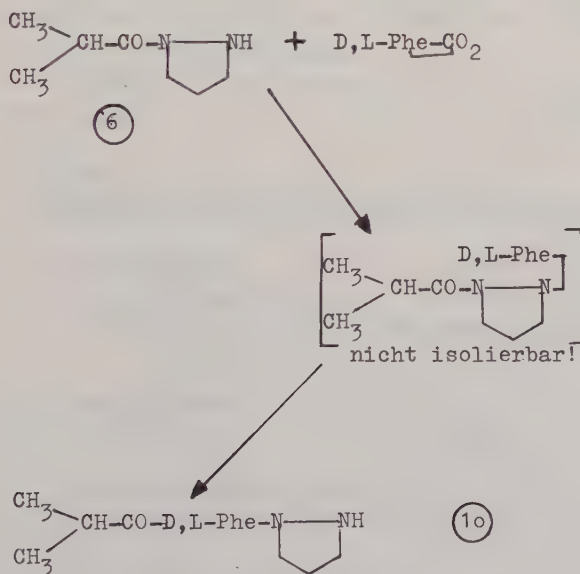
- | | | |
|---|---|-------------------------|
| 1 | Cbzo-Gly-NCH ₃ -NCH ₃ H | (5) |
| 2 | Cbzo-Gly-D,L-Phe-NCH ₃ -NCH ₃ H | (9) |
| 3 | Cbzo-Gly-D,L-Phe-NCH ₃ -NCH ₃ H | Vergleichssubstanz (16) |
| | D,L-Phe | |
| 4 | Cbzo-Gly-NCH ₃ -NCH ₃ H | |

Zur Überprüfung von Fall 2 wurde das Aminodiacylhydrazin in (9) umgelagert, das Reaktionsprodukt (9) chromatographiert und mit authentischem (9) verglichen. N-(Carbo-benzoxymethyl)-N,N'-dimethyl-N'-(D,L-phenylalanyl)-hydrazin lagert sich in Essigester ohne die katalytische Wirkung von Eisessig in ca. 48 Stunden in (9) um.

Aus Figur 2 ergibt sich, dass der Doppel-Fleck nicht auf der Gegenwart von (9) beruht.

Die Abklärung des Sachverhaltes in bezug auf Fall 1 und 3 geht über den Rahmen dieser Dissertation hinaus.

6. Herstellung von Isobutyryl-D,L-phenylalanin-pyrazolidid (10) aus Isobuttersäure-pyrazolidid durch Aminoacylierung mittels D,L-Phenylalanin-N-carboxyanhydrid und anschliessende Umlagerung.



Die Herstellung von N-(Isobutyryl)-N'-(D,L-phenylalanyl)-pyrazolidin als freie Base ist nicht möglich. Es lagert sich so rasch in (10) um, dass seine Isolierung praktisch undurchführbar ist.

Auf diese Weise vermischen sich die Aminoacylierungsreaktion und die Umlagerungsreaktion miteinander. Unter Berücksichtigung dieser Aspekte ist die erhaltene niedrige Ausbeute an (10) (26,9%) verständlich. Der Schmelzpunkt betrug 152-154°.

IV. Synthesen der Vergleichsverbindungen mittels bekannter Methoden.

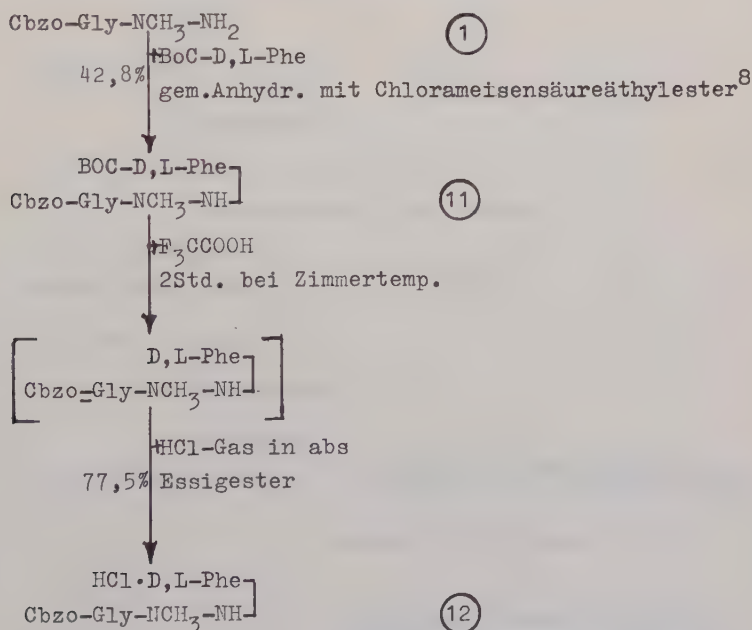
Die Identifizierung der durch Aminoacylierung gewonnenen α -Aminodiacylhydrazine erfolgte durch Vergleich mit authentischem Material (Schmelzpunkte, Mischschmelzpunkte, R_f -Werte und Analysen).

Die Synthesen der für Vergleichszwecke benötigten Verbindungen erfolgten- soweit vorhanden - nach Literaturvorschriften. Weitere Einzelheiten sind im experimentellen Teil zu finden.

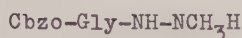
Die durchgeführten Synthesen werden in Schema 8 veranschaulicht.

Schema 8

Synthesenübersicht der Vergleichsverbindungen.



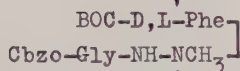
Fortsetzung Schema 8



(2)

78%

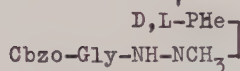
BOC-D,L-Phe
gem. Anhydr. mit
Chlorameisensäureäthylester⁸⁾



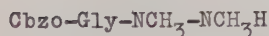
(13)

71,7%

+ F₃CCOOH
2 Std. bei Zimmertemp.



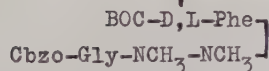
(14)



(5)

78,3%

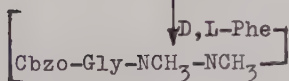
BOC-D,L-Phe
gem. Anhydr. mit
Chlorameisensäureäthylester⁸⁾



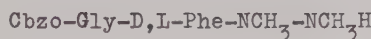
(15)

+ F₃CCOOH

2 Std. bei
Zimmertemp.



48 Std. in Essigester
zur Umlagerg. stehengelassen



(16)

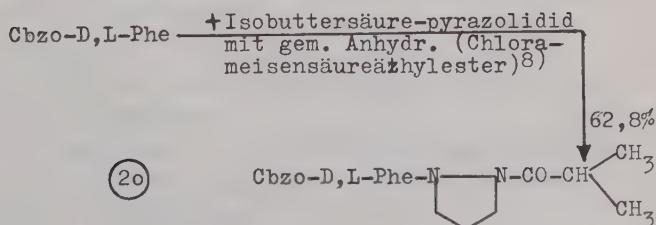
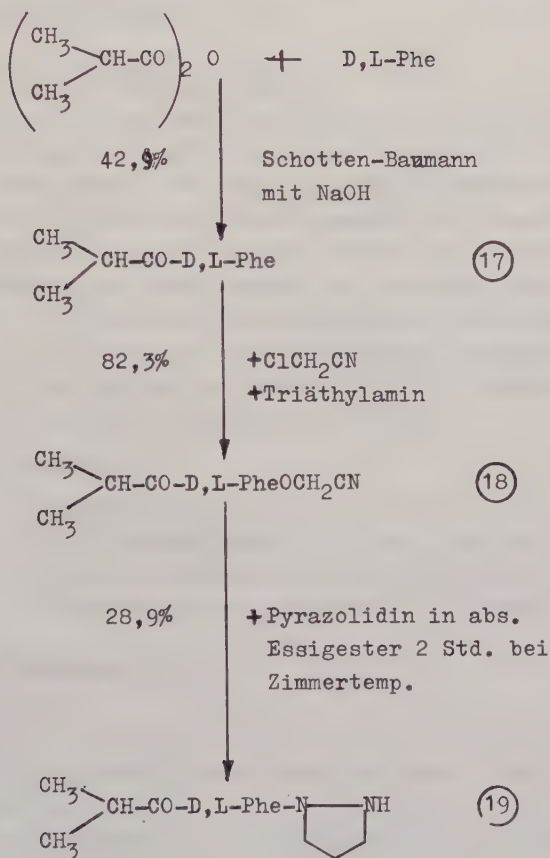


mit sym. Dimethylhydrazin
in abs. Essigester 3 Std.
bei Zimmertemp. 35%

EXPERIMENTELLER

TEIL

Fortsetzung Schema 8



I. Übersicht über einige analytische und präparative Routine-Methoden.

a.) Dünnschichtchromatographie.

Zur Kontrolle von Reaktionsabläufen, für die Identifizierung von Substanzen durch Vergleich ihres chromatographischen Verhaltens und für Reinheitsprüfungen wurde die Dünnschichtchromatographie auf Kieselgel-G nach Stahl¹²⁾ benützt. Es sind Platten mit einer zinksilikathaltigen Sorptionsschicht verwendet worden. Betrachtet man diese Platten im UV-Licht (Wellenlänge 254 mμ), so wird die Schicht durch Fluoreszenz aufgeleuchtet. Dadurch werden die im UV-Licht normalerweise nicht sichtbaren Verbindungen erkennbar.

1. Fließmittel.

Als Fließmittel eignen sich besonders gut:

- 1) Chloroform/Methanol 2:1 (v/v) und 3:1 (v/v)
- 2) Chloroform/Isopropanol 10:1 (v/v) und 2:1 (v/v)
- 3) n-Butanol/Eisessig/Wasser 4:1:1 (v/v/v)

2. Nachweisreagenzien.

Ninhydrin

Nachweis von Verbindungen mit einer freien Aminogruppe und substituierten Säurehydraziden (Erst nach längerem Erhitzen sichtbar)

1,5 g Ninhydrin in 15 ml Eisessig + 500 ml n-Butanol.
Tolidin/Chlor¹³⁾

Hydrazide, Diacylhydrazide, und Aminodiacylhydrazine erscheinen als blaue Flecken.

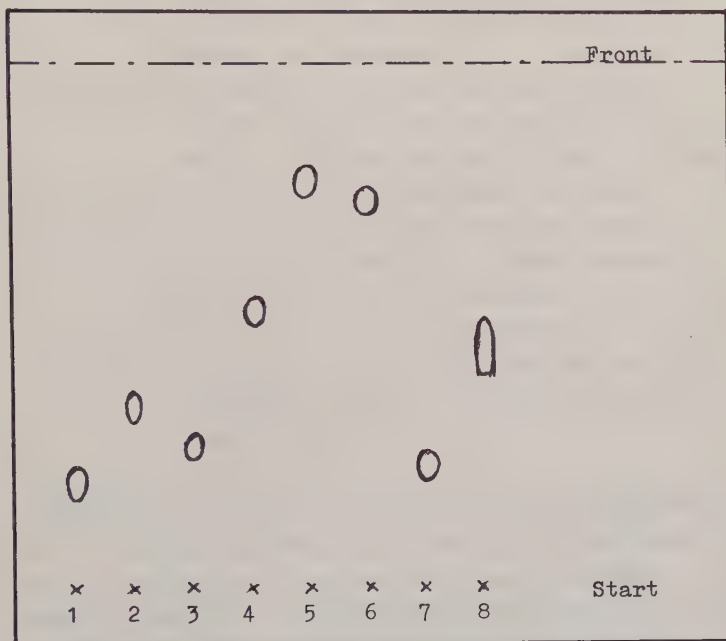
Tollens-Reagens.

N-Acyl-N'-methylhydrazide und Pyrazolidide sind ohne Erwärmen Tollens-positiv.

0,5 ml 0,1N AgNO₃ und 0,5 ml 2N NaOH vorlegen, 2N NH₃ zufügen bis der Niederschlag sich auflöst und mit Wasser auf 40 ml auffüllen.

Figur 2

Dünnschichtchromatogramm auf Kieselgel G nach Stahl¹²⁾
mit Chloroform/Isopropanol 2:1 (v/v) als Fließmittel.



- | | | |
|---|---|------|
| 1 | Cbzo-Gly-NH-NH ₂ | (1) |
| 2 | Cbzo-Gly-NCH ₃ -NH ₂ | (2) |
| 3 | Cbzo-Gly-NH-NCH ₃ H | (5) |
| 4 | Cbzo-Gly-NCH ₃ -NCH ₃ H | (11) |
| 5 | Cbzo-Gly-NCH ₃ -NH
BOC-D,L-Phe] | (13) |
| 6 | Cbzo-Gly-NH-NCH ₃
BOC-D,L-Phe] | (14) |
| 7 | Cbzo-Gly-NH-NCH ₃
D,L-Phe] | (12) |
| 8 | Cbzo-Gly-NCH ₃ -NH
HCl·D,L-Phe] | |

Die Schmelzpunkte wurden auf einem Kofler-Block bestimmt und sind unkorrigiert.

Die Siedepunkte sind ebenfalls unkorrigiert.

b.) Qualität einiger häufig verwendeter Lösungsmittel.

- Dioxan : Im Handel erhältliches, nach Hess und Frahm¹⁴⁾ gereinigtes Produkt, wurde zweimal über Natrium destilliert und im Dunkeln aufbewahrt.
- Eisessig : Es wurden stets die zur Analyse und Chromatographie geeigneten, gegen Chromsäure indifferenten Qualitäten der Firma Merck bzw. Riedel-de-Haën benutzt.
- Chloroform: Absolutes Chloroform wurde vor Gebrauch stets frisch aus dem im Handel erhältlichen stabilisierten Produkt durch Destillation über P_2O_5 hergestellt.
- Essigester: Es wurde stets die zur Analyse und Chromatographie geeignete Qualität der Firma Fluka verwendet.

c.) Allgemeine Arbeitsvorschrift für Säulenchromatographie.

Bei der Säulenchromatographie werden als Säulenfüllung Kieselgel und Aluminiumoxyd (nach Brockmann-Merck) verwendet. Die trockene Kieselgelfüllung sollte etwa die 60- bis 100-fache Menge der zu chromatographierenden Substanz betragen, bei Alox-Chromatographie hingegen benötigt man nur die 30- bis 40-fache Menge. Man löst die Substanz in 4 bis 5 ml des Eluiermittels, trägt die Lösung auf die Säule auf, lässt sie einsickern und spült mit etwa 4 bis 5 ml Fluiermittel nach. Danach verschliesst man die Säule mit einem durchgebohrten Zapfen und dosiert die Elutionsflüssigkeit aus einer Vorratsflasche so, dass unten 60 Tropfen pro Minute austropfen. Die Fraktionen prüft man laufend mittels Dünnschichtchromatographie.

d.) Herstellung vom D,L-Phenylalanin-N-carboxyanhydrid nach der Phosgenmethode¹⁵⁾.

Man suspendiert 10 g D,L-Phenylalanin in 200 ml abs. Dioxan und leitet unter Rühren bei 50° in langsamem Strom Phosgen durch, bis die suspendierte Aminosäure sich vollständig gelöst hat. Das Phosgen und die entstandene Salzsäure werden mittels Durchleiten von trockenem Stickstoff aus der Lösung entfernt, das Lösungsmittel unter Feuchtigkeitsabschluss am Vacuum bei ca. 40° abgedampft und der meist ölige Rückstand aus Essigester/Petroläther kristallisiert. Zur vollständigen Entfernung von Säureresten muss das N-Carboxyanhydrid mindestens zweimal umkristallisiert werden.

II. Synthese der Ausgangsmaterialien.

1. N-Carbobenzoxycglycin-N-methylhydrazid (1)

a.) Gemischtes Anhydrid mit Pivaloylchlorid ⁷⁾.

Man löst 10,45 g (50 mMol) Carbobenzoxycglycin in 150 ml abs. Chloroform, kühlt auf -10° ab, fügt unter kräftigem Rühren 7 ml (50 mMol) Triäthylamin und 6,15 ml (50 mMol) Pivaloylchlorid zu, versetzt nach 10 Minuten mit einer vorgekühlten Lösung von 5,4 ml (100 mMol) Methylhydrazin in 50 ml abs. Chloroform und lässt bei Zimmertemperatur $1\frac{1}{2}$ Stundeniterrühren. Nach Einengen am Vacuum zur Trockene nimmt man den Rückstand in Essigester auf, wäscht mit 10-proz. Hydrogencarbonatlösung, extrahiert das Hydrazid mit 2N Salzsäure, stellt den sauren Extrakt mit 2N Natriumhydroxyd auf pH 8-9, schüttelt dreimal mit 10 Vol.-Teilen Essigester aus. Nach Trocknen über Natriumsulfat engt man die Lösung am Vacuum zur Trockene ein. Das Isomerengemisch ⁶⁺² kristallisiert aus Essigester/Petroläther.
Ausbeute: 3,375 g (35,9 %)

b.) Gemischtes Anhydrid mit Chlorameisensäureäthylester ⁸⁾.

Man löst 12,9 g (61,5 mMol) Carbobenzoxycglycin in 150 ml abs. Chloroform, kühlt auf -10° ab, fügt unter kräftigem Rühren 14 ml (100 mMol) Triäthylamin und 9,6 ml (100 mMol) Chlorameisensäureäthylester zu, versetzt nach 10 Minuten mit einer Lösung von 10,8 ml (200 mMol) Methylhydrazin in 50 ml abs. Chloroform und lässt bei Zimmertemperatur $1\frac{1}{2}$ Stunden stehen. Nach Einengen am Vacuum zur Trockene nimmt man den Rückstand in Essigester auf, wäscht mit 10-proz. Hydrogencarbonatlösung, extra-

hiert das Hydrazid mit 2N Salzsäure, stellt den sauren Extrakt mit 2N Natriumhydroxyd auf pH 8-9, schüttelt dreimal mit 10 Vol.-Teilen Essigester aus. Nach Trocknen über Natriumsulfat engt man die Lösung am Vacuum zur Trockene ein. Das Iso-merengemisch ²⁺² kristallisiert aus Essigester/Petroläther.

Ausbeute: 12,26 g (84 %)

Beide Produkte wurden über das Salicylidenderivat gereinigt. (Siehe S. 34)

c.) Durch Spaltung von N-(Carbobenzoxylglycyl)-N-methyl-N'-salicylidenhydrazin (3)

Man löst 10 g (30,7 mMol) Salicylidenverbindung in 60 ml abs. Aethanol, fügt 1,84 ml (36,8 mMol) Hydrazinhydrat sowie 3 Tropfen Eisessig zu und lässt das Gemisch 1 Stunde unter Rückfluss kochen. Nach Eindampfen am Vacuum zur Trockene nimmt man den Rückstand in Essigester auf, wäscht mit 2N Natriumhydroxyd, extrahiert das Hydrazid mit 2N Salzsäure, stellt den sauren Extrakt mit 2N Natriumhydroxyd auf pH 8-9 und schüttelt dreimal mit 10 Vol.-Teilen Essigester aus.

Nach Waschen, Trocknen und Eindampfen des Essigesters bleiben 6,05 g (76,7 %) N-Carbobenzoxylglycin-N-methylhydrazid vom Schmelzpunkt 73° bis 74° zurück.

Zur Analyse kristallisiert man das Hydrazid aus Essigester/Petroläther um, trocknet bei 50° und 0,001 Torr. 22 Stunden über P₂O₅. Smp.: 73-74°.

C ₁₁ H ₁₅ N ₃ O ₃	ber.: C 55,68 %	H 6,37 %	N 17,71 %
/237,25/	gef.: 55,53 %	6,48 %	17,47 %

2. N-Carbobenzoxyglycin-N'-methylhydrazid (2)

Man löst 0,65 ml (12 mMol) Methylhydrazin in 20 ml abs. Essigester, fügt 2,453 g (10 mMol) Carbobenzoxyglycin-cyanmethylester und 3 Tropfen Eisessig zu und lässt die Lösung bei Zimmertemperatur über Nacht stehen.

Nach Einengen am Vacuum zur Trockene nimmt man den Rückstand in Essigester auf, wäscht mit 2N Essigsäure, 10-proz. Hydrogencarbonatlösung, Wasser, ges. Kochsalzlösung, trocknet über Natriumsulfat und engt am Vacuum zur Trockene ein. Den Rückstand nimmt man in abs. Aceton auf, kocht 30 Minuten unter Rückfluss und engt am Vacuum auf etwa 4 bis 5 ml Volumen ein. Man chromatographiert die Lösung auf einer Kieselgel-Säule.

Säulenfüllung: 100 g Kieselgel-G

Eluiermittel : abs. Aceton

Rohausbeute : 1,87 g (78,9 %)

Ausbeute nach Chromatographie: 1,62 g (68 %)

Zur Analyse kristallisiert man das Hydrazid aus Essigester/Petroläther um, trocknet bei 60° und 0,01 Torr. 22 Stunden über P₂O₅. Smp. : 93-94°.

C ₁₁ H ₁₅ N ₃ O ₃ /237,25/	ber.:	C 55,68 %	H 6,37 %	N 17,71 %
	gef.:	55,89 %	6,58 %	17,74 %

3. N-(Carbobenzoxyglycyl)-N-methyl-N'-salicylidenhydrazin (3)

a.) Aus Cbzo-Glycin und Salicyliden-methylhydrazin

Man löst 0,849 g (4,06 mMol) Carbobenzoxyglycin in 10 ml abs. Chloroform, kühlt auf -10° ab, fügt unter kräftigem Rühren 0,57 ml (4,06 mMol) Triäthylamin und 0,39 g (4,06 mMol) Chlorameisensäure-äthylester zu, versetzt nach 10 Minuten mit einer

Lösung von 0,61 g (4,06 mMol) Salicyliden-methylhydrazin in 10 ml abs. Chloroform und lässt bei Zimmertemperatur $1\frac{1}{2}$ Stunden stehen. Nach Einengen am Vacuum zur Trockene nimmt man den Rückstand in Aether auf, wäscht mit 2N Citronensäure, 10-proz. Hydrogencarbonatlösung, Wasser, ges. Kochsalzlösung, trocknet über Natriumsulfat und engt am Vacuum zur Trockene ein. Den Rückstand kristallisiert man aus Aethanol um. Smp.: 150-152°

Ausbeute: 0,25 g (19,9 %)

Zur Analyse kristallisiert man die Verbindung nochmals aus abs. Aethanol um, trocknet bei 70° und 0,02 Torr. 15 Stunden über P₂O₅. Smp.: 152-154°

C ₁₈ H ₁₉ N ₃ O ₄	ber.: C 63,83 %	H 5,61 %	N 12,31 %
/326,36/	gef.: 63,82 %	5,77 %	12,49 %

b.) Aus N-Carbobenzoxycystein-N-methylhydrazid und Salicylaldehyd.

Man löst 3,37 g (14,21 mMol) N-Carbobenzoxycystein-N-methylhydrazid (Isomerengemisch!) im Minimum von abs. Aethanol, fügt 1,79 ml (17,05 mMol) (1,2 Äq.) Salicylaldehyd und 2 Tropfen Eisessig zu und lässt das Gemisch 30 Minuten unter Rückfluss kochen. Nach Abkühlen scheidet sich ein weisser kristalliner Bodenkörper mit Schmelzpunkt 152-153° aus. Ausbeute: 4,08 g Salicylidenverbindung; entspricht

2,96 g N-Carbobenzoxycystein-N-methylhydrazid. Also ist die Ausgangsmischung mit 12,1 % Isomer verunreinigt.

4. Salicyliden-methylhydrazin (4)

Man kühlt 1,05 ml (10 mMol) Salicylaldehyd auf -10° ab, lässt 0,54 ml (10 mMol) Methylhydrazin langsam zutropfen und erhitzt das Gemisch 30 Minuten auf dem

Dampfbad. Nach Aufnehmen in Wasser äthert man die wässrige Schicht aus, trocknet die ätherische Lösung über Natriumsulfat, engt am Vacuum zur Trockene ein und kristallisiert den Rückstand aus Methanol/Wasser um. Man erhält verfilzte Nadeln vom Schmelzpunkt $45-46^{\circ}$.

Ausbeute: 0,61 g (40,6 %)

Die Daten dieser Verbindung stimmen mit denjenigen eines in der Literatur beschriebenen Produktes überein¹⁶⁾.

5. Benzyliden-methylhydrazin (4a)

Man löst 18,77 g (40,6 mMol) Methylhydrazin sowie 41,2 ml (40,6 mMol) Benzaldehyd in 80 ml abs. Äthanol und lässt 3 Stunden unter Rückfluss kochen. Nach Einengen am Vacuum bleibt ein gelbes Öl, das man vacuumdestilliert.

Sdp.: bei 0,1 Torr. $85-86^{\circ}$

Ausbeute: 37,75 g (70 %)

$C_8H_{10}N_2$	ber.: C 71,61 %	H 7,51 %	N 20,88 %
/134,18/	gef.: 71,61 %	7,62 %	21,04 %

Die Daten dieser Verbindung stimmen mit denjenigen eines in der Literatur beschriebenen Produktes überein¹⁶⁾.

6. N-(Carbobenzoxycglycyl)-N-methyl-N'-benzylidenhydrazin

a.) Aus Cbzo-Glycin und Benzyliden-methylhydrazin. (4b)

Man löst 7,67 g (36,7 mMol) Carbobenzoxycglycin in 70 ml abs. Dioxan, kühlt auf 0° bis -5° ab, fügt unter kräftigem Rühren 5,14 ml (36,7 mMol) Triäthylamin und 3,52 ml (36,7 mMol) Chlorameisen-

säureäthylester zu, versetzt nach 10 Minuten mit einer vorgekühlten Lösung von 4,93 g (36,7 mMol) Benzyliden-methylhydrazin in 25 ml abs. Dioxan und lässt bei Zimmertemperatur 1½ Stunden weitererrühren. Das gebildete Triäthylaminhydrochlorid filtriert man ab und engt die Lösung am Vacuum zur Trockene ein. Den Rückstand nimmt man in 110 ml Äther auf, wäscht mit 2N Citronensäure, 10-proz. Hydrogencarbonatlösung, Wasser, ges. Kochsalzlösung, trocknet über Natriumsulfat und engt am Vacuum zur Trockene ein. Den Rückstand kristallisiert man aus Äther/Petroläther um.

Smp.: 95-96°

Ausbeute: 3,8 g (26,8 %)

b.) Aus Cbz-Glycin-N-methylhydrazid und Benzaldehyd.

Man löst 0,15 g (0,63 mMol) N-(Carbobenzoxycglycin)-N-methylhydrazid und 0,2 g (4,88 mMol) Benzaldehyd in 5 ml abs. Äthanol, setzt 1 Tropfen Eisessig zu und lässt 15 Minuten unter Rückfluss kochen (Stickstoffatmosphäre). Anschliessend lässt man die Lösung 46 Stunden bei 38° stehen, filtriert den Niederschlag ab und kristallisiert aus Äther um.

Smp.: 95-96°. Stark hygroskopisch!!

Zur Analyse trocknet man das Hydrazon bei 50° und 0,02 Torr. 16 Stunden über P₂O₅.

C ₁₈ H ₁₉ N ₃ O ₃	ber.: C 66,44 %	H 5,89 %
/325,35/	gef.: 66,60 %	6,15 %

7. Verseifungsversuche von N-(Carbobenzoxycglycyl)-N-methyl-N'-benzylidenhydrazin.

a. Man schüttelt 20 mg (0,052 mMol) Benzylidenverbindung mit 10 ml 2N Salzsäure 2 Stunden bei Zimmertemperatur. Keine Spaltung!!

- b. Man schüttelt 20 mg 0,052 mMol) Benzylidenverbindung mit 5 ml konz. Salzsäure 1 Stunde bei Zimmertemperatur. Unbefriedigende Spaltung.
- c. Man löst 500 mg (1,3 mMol) Substanz in abs. Äthanol (Minimum!!) und leitet unter Eiskühlung trockenes Salzsäuregas in die Lösung (1 Stunde). Erst nach 2-3-stündigem Einleiten entsteht eine geringe Menge des Hydrochlorids.

Diese Schutzgruppe ist schwer abzuspalten und nicht in präparativem Mass. Ausserdem werden Peptidbindungen ebenfalls gespalten.

8. N-Carbobenzoxycystein-N,N'-dimethylhydrazid (5)

Man löst 1,50 g (30 mMol) sym.-Dimethylhydrazin in 50 ml abs. Essigester, fügt 6,133 g (25 mMol) Carbobenzoxycysteinmethyl-ester und 3 Tropfen Eisessig zu, lässt über Nacht bei Zimmertemperatur stehen, engt am Vacuum zur Trockene ein, nimmt den Rückstand in Essigester auf, wäscht mit 2N Essigsäure und 10-proz. Hydrogencarbonatlösung, extrahiert das Hydrazid mit 2N Salzsäure, stellt den sauren Extrakt mit 2N Natronlauge auf pH 8-9 und schüttelt dreimal mit 10 Vol.-Teilen Essigester aus.

Nach Waschen, Trocknen über Natriumsulfat und Eindampfen des Essigesters bleiben 5,55 g (63 %) des öligen Hydrazides zurück.

9. Isobuttersäure-pyrazolidin (6)

Man fügt zu 50 g (238 mMol) Diisobutylpyrazolidin 9,5 g (238 mMol) pulverisiertes, in 500 ml 96-proz. Äthanol gelöstes Natriumhydroxyd zu und erhitzt 7 Stunden unter Rückfluss (Badtemperatur ca. 100°).

Nach Abdestillieren des Alkohols bei Normaldruck durch eine Kolonne versetzt man den Rückstand mit Äther, filtriert das Isobuttersäure-Natriumsalz ab und wäscht mit Äther gut nach. Man dampft die Ätherlösung durch eine Kolonne bei Normaldruck ab, versetzt den Rückstand mit 150 ml 2N Salzsäure und extrahiert dreimal mit Äther. (Diisobutyryl-pyrazolidin geht in den Äther.) Nun stellt man die Lösung mit festem Natriumcarbonat schwach phenolphthalein-alkalisch und extrahiert im Kutscher-Steudel-Apparat über Nacht mit Äther. Nach Abdampfen des Äthers bei Normaldruck durch eine Kolonne destilliert man den Rückstand im Hochvacuum. Kp. bei 0,1 Torr. 88-90°
 Ausbeute: 26,3 g (76 %)
 Die physikalischen Daten stimmten mit den in der Literatur angegebenen Daten überein.²⁾

III. Verschiedenes.

1. Isopropyliden-methylhydrazin.

Man tropft 50,6 ml Aceton (710 mMol) zu 5,4 ml (100 mMol) Methylhydrazin und lässt 30 Minuten unter Rückfluss kochen. Nach Abdampfen des Acetons im Vacuum bleibt ein langsam gelblich werdendes Öl zurück, das man bei Normaldruck unter Stickstoffatmosphäre fraktioniert.

Vorlauf: Sdp.: 56-59°

Hauptfraktion: Sdp.: 94-95°

Ausbeute: 8,254 g (95,9 %)

2. Diacetyl-mono(N'-methyl)-hydrazon.

Man kühlt 8,6 g (100 mMol) Diacetyl auf -18° ab und lässt 4,6 g (5,4 ml = 100 mMol) Methylhydrazin langsam zutropfen.

Nun vacuumdestilliert man das Gemisch.

Vorlauf bis 87°

Sdp.: bei 10 Torr. 87-90°

Ausbeute 8,62 g (84,5 %)

IV. Aminoacylierungsreaktionen an hy-alkylierten Säurehydraziden.

1. N-(Carbobenzoxylglycyl)-N-methyl-N'-(D,L-phenylalanyl)-hydrazin)-hydrochlorid (7)

Man löst 461,4 mg (2 mMol) N-(Carbobenzoxylglycin)-N-methylhydrazid in einer Mischung von 4 ml Eisessig und 3,78 g (40 mMol) Monochloressigsäure, wärmt die Lösung auf 80° vor, fügt 382,2 mg (2 mMol) D,L-phenylalanin-N-carboxyanhydrid zu und lässt die Lösung bei 80° 15 Minuten stehen.

Nach Abschrecken der Lösung setzt man etwa 3 Vol.-Teile mit trockenem Salzsäuregas gesättigten Essigester zu, lässt die Lösung 1-2 Minuten stehen und engt am Vacuum zur Trockene ein. Dies wiederholt man 3-4-mal. Nach Abdampfen (am Vacuum) setzt man den Rückstand zur Hochvacuumsublimation an (60° und 0,05 Torr). Auf diese Weise entfernt man die Monochloressigsäure. Den Sublimationsrückstand kristallisiert man aus abs. Äthanol um.

Smp.: 191-197°

Ausbeute: 338 mg (43,8 %).

Zur Analyse kristallisiert man die Substanz nochmals aus abs. Äthylalkohol um und trocknet während 2 Tagen bei Zimmertemperatur an der Luft.

Smp.: 193-197°

$C_{20}H_{24}N_4O_4 \cdot HCl$	ber.: C 57,07 %	H 5,99 %	N 13,31 %
	gef.: 57,22 %	6,18 %	12,97 %

/420,89/

Der Mischschmelzpunkt mit auf anderem Wege hergestelltem authentischem Vergleichsmaterial zeigt keine Depression. Ebenso stimmen Analyse und chromatographisches Verhalten mit demjenigen des Vergleichspräparates überein.

2. N-(Carbobenzoxyglycyl)-N'-methyl-N'-(D,L-phenylalanyl)-hydrazin (8)

Man löst 2,3725 g (10 mMol) N-(Carbobenzoxyglycin)-N'-methyl-hydrazid in 100 ml Eisessig, fügt 1,9118 g (10 mMol) D,L-Phenylalanin-N-carboxyanhydrid zu, lässt 10 Minuten bei Zimmertemperatur reagieren, hängt bis zur Beendigung der CO₂-Entwicklung ans Vacuum, versetzt mit 6 ml 2N Salzsäure (1,2 Aq.) und engt am Vacuum zur Trockene ein. Den Rückstand nimmt man in Wasser auf, wäscht mit Essigester, stellt die saure, wässrige Lösung mit 2N Natronlauge auf pH 8-9, extrahiert die freie Base mit dreimal 10 Vol.-Teilen Essigester, trocknet den Extrakt über Natriumsulfat und engt am Vacuum zur Trockene ein.

Nach Umkristallisieren aus Chloroform/Petroläther erhält man 2,408 g ((62,6 %) kristalline Substanz, die bei 143-145° schmilzt.

Zur Analyse kristallisiert man die Substanz aus Chloroform/Petroäther nochmals um, trocknet bei 70° und 0,01 Torr. 17 Stunden über P₂O₅. Der Schmelzpunkt bleibt unverändert.

C ₂₀ H ₂₄ N ₄ O ₄	ber.:	C 62,48 %	H 6,29 %	N 14,58 %
/384,41/	gef.:	62,32 %	6,38 %	14,51 %

Der Mischschmelzpunkt mit der Vergleichssubstanz zeigt keine Depression. Die Analysen- und R_f-Werte der Verbindungen sind identisch.

3. N-(Carbobenzoxycglycyl-D,L-phenylalanin)-N,N'-dimethylhydrazid. (9)

Man löst 1,13 g (4,5 mMol) N-Carbobenzoxycglycin-N,N'-dimethylhydrazid in einer Mischung von 0,99 ml (13,4 mMol) Trifluoressigsäure und 45 ml Eisessig, fügt 1,7199 g (9 mMol) D,L-Phenylalanin-N-carboxyanhydrid zu, lässt zwei Stunden bei 60° stehen, engt am Vacuum zur Trockene ein, nimmt den Rückstand in Wasser auf, stellt die Lösung mit 2N Natriumhydroxyd auf pH 8-9, extrahiert das Hydrazid mit Essigester und trocknet über Natriumsulfat. Man setzt der Essigesterlösung 3 Tropfen Eisessig zu, lässt zur Umlagerung 48 Stunden bei Zimmertemperatur stehen und engt am Vacuum zur Trockene ein.

Nach Umkristallisieren des umgelagerten Produktes aus Essigester/Petroläther erhält man 1,09 g (60,8 %) kristallines Hydrazid, das bei 134-136° schmilzt.

Zur Analyse trocknet man das Hydrazid bei 70° und 0,01 Torr. 18 Stunden über P₂O₅.

C ₂₁ H ₂₆ N ₄ O ₄	ber.:	C 63,30 %	H 6,58 %	N 14,06 %
/398,45/	gef.:	63,40 %	6,70 %	14,26 %

4. Isobutyryl-D,L-phenylalanin-pyrazolidid. (10)

Man löst 1,8499 g (13 mMol) Isobuttersäure-pyrazolidin in 22 ml Eisessig, fügt 2,4856 g (13 mMol) D,L-Phenylalanin-N-carboxyanhydrid zu und lässt das Gemisch bei Zimmertemperatur etwa 5 Minuten stehen. Nach dieser Zeit fügt man 1,64 g (13 mMol) Oxalsäure-dihydrat in 20 ml Wasser zu der Lösung und engt am Vacuum zur Trockene ein.

Den Rückstand nimmt man zur Umlagerung in wenig Wasser auf, fügt 26 ml 1N Natriumhydroxyd zu, schüttelt mit 10 Vol.-Teilen Essigester aus, trocknet den Extrakt über Natriumsulfat und engt am Vacuum zur Trockene ein.

Den Rückstand kristallisiert man aus Essigester/Petroläther um.

Smp.: 150-152°

Rohausbeute: 1,383 g (36,8 %)

Nach nochmaligem Umkristallisieren bleiben 1,017 g (26,9 %) Substanz vom Schmelzpunkt 152-154° zurück.

Der Mischschmelzpunkt mit der Vergleichssubstanz ergab keine Depression.

V. Synthesen der Vergleichsmaterialien.

1. N-(Carbobenzoxyglycyl)-N-methyl-N'-(BOC-D,L-phenylalanyl)-hydrazin. (11)

Man löst 0,94 g (3,58 mMol) BOC-D,L-Phenylalanin in 50 ml abs. Chloroform, kühlt auf -10° ab, fügt unter kräftigem Rühren 0,5 ml (3,58 mMol) Triäthylamin und 0,34 ml (3,58 mMol) Chlorameisensäureäthylester zu, versetzt nach 10 Minuten mit einer vorgekühlten Lösung von 0,85 g (3,58 mMol) N-Carbobenzoxyglycin-N-methylhydrazid in 50 ml abs. Chloroform und lässt bei Zimmertemperatur 1½ Stunden weitererrühren. Nach Eindampfen des Chloroforms am Vacuum nimmt man den Rückstand in Essigester auf, wäscht mit 2N Citronensäure, 10-proz. Hydrogencarbonatlösung, Wasser und ges. Kochsalzlösung, trocknet über Natriumsulfat und engt am Vacuum zur Trockene ein.

Ausbeute: 1,03 g (58,9 %) Öl!!

Das Oel reinigt man durch Kieselgelchromatographie.

Säulenfüllung: 100 g Kieselgel-G

Eluiermittel: Chloroform/Isopropanol 10:1 (v/v)

Ausbeute: 72,8 % der Einwaage = 42, 8 %

Zur Analyse kristallisiert man das Produkt aus Chloroform/Petroläther um und trocknet bei 100° und 0,02 Torr. 18 Stunden über P₂O₅.

Smp.: 185-186°

C ₂₅ H ₃₂ N ₄ O ₆	ber.:	C 61,96 %	H 6,66 %	N 11,56 %
/484,78/	gef.:	61,77 %	6,77 %	11,65 %

1a.) N-(Carbobenzoxycglycyl)-N-methyl-N'-(D,L-phenylalanyl)-hydrazin-hydrochlorid. (12)

Man spaltet die BOC-Gruppe von (11) mit Trifluoressigsäure (2 Stunden bei Zimmertemperatur stehen lassen) ab, dampft die Lösung am Vacuum zur Trockene ein, nimmt den Rückstand in Wasser auf, stellt die saure Lösung mit 2N Natriumhydroxyd auf pH 8-9 und extrahiert die freie Base mit Essigester. Nach Trocknen über Natriumsulfat leitet man trockenes Salzsäuregas in die Lösung bis das Hydrochlorid ausfällt. Man erhält das N-(Carbobenzoxycglycyl)-N-methyl-N'-(D,L-phenylalanyl)-hydrazin-hydrochlorid vom Schmelzpunkt 193-197°. Ausbeute : 77,5%

2. N-(Carbobenzoxycglycyl)-N'-methyl-N'-(BOC-D,L-phenylalanyl)-hydrazin. (13)

Man löst 0,95 g (3,57 mMol) BOC-D,L-Phenylalanin in 20 ml abs. Chloroform, kühlt auf -10° ab, fügt 0,5 ml (3,57 mMol) Triäthylamin und 0,44 ml (3,57 mMol) Pivaloylchlorid zu, versetzt nach 10 Minuten mit einer vorgekühlten Lösung von 0,85 g (3,57 mMol)

N-Carbobenzoxylglycin-N'-methylhydrazid in 30 ml abs. Chloroform und lässt die klare Lösung bei Zimmertemperatur $1\frac{1}{2}$ Stunden stehen. Nach Abdampfen des Chloroforms am Vacuum nimmt man den Rückstand in Essigester auf, wäscht mit 2N Citronensäure, 10-proz. Hydrogencarbonatlösung, Wasser, ges. Kochsalzlösung, trocknet über Natriumsulfat und engt am Vacuum zur Trockene ein. Den Rückstand kristallisiert man aus Essigester/Petroäther um. Schmelzpunkt des Rohproduktes: $171-172^{\circ}$.

Ausbeute: 1,35 g (78 %) Smp. nach nochmaliger Umkristallisation $172-174^{\circ}$ Zur Analyse kristallisiert man nochmals aus Essigester/Petroläther um, wobei der Schmelzpunkt unverändert bleibt, trocknet bei 70° und 0,01 Torr. 18 Stunden über P_2O_5 .

$C_{25}H_{32}N_4O_6$	ber.:	C 61,96 %	H 6,66 %	N 11,56 %
/484,78/	gef.:	62,04 %	6,88 %	11,40 %

3. N-(Carbobenzoxylglycyl)-N'-methyl-N'-(D,L-phenylalanyl)-hydrazin. (14)

Man löst 1,0 g (2,06 mMol) N-(Carbobenzoxylglycyl)-N'-methyl-N'-(BOC-D,L-phenylalanyl)-hydrazin in überschüssiger Menge (Lösungsmittel!!) Trifluoressigsäure und lässt bei Zimmertemperatur 2 Stunden stehen. Nach Abdampfen der Trifluoressigsäure nimmt^{man} den Rückstand in Wasser auf, stellt die saure Lösung mit 2N Natriumhydroxyd auf pH 8-9, extrahiert die freie Base dreimal mit 10 Vol.-Teilen Essigester, trocknet den Extrakt über Natriumsulfat und dampft am Vacuum zur Trockene ein. Nach Umkristallisieren aus Essigester/Petroläther erhält man 0,57 g (71,7 %) freie Base, die bei $143-144^{\circ}$ schmilzt.

Zur Analyse kristallisiert man die freie Base nochmals aus Essigester/Petroläther um, trocknet bei 80° und 0,01 Torr. 24 Stunden über P₂O₅.

Smp.: 143-145°

C ₂₀ H ₂₄ N ₄ O ₄	ber.:	C 62,48 %	H 6,29 %	N 14,58 %
/384,41/	gef.:	62,20 %	6,32 %	14,28 %

4. N-(Carbobenzoxycyl)-N'-(BOC-D,L-phenylalanyl)-N,N'-dimethylhydrazin. (15)

Man löst 1,018 g (3,84 mMol) BOC-D,L-Phenylalanin in 25 ml abs. Chloroform, kühlt auf -10° ab, fügt 0,54 ml (3,84 mMol) Triäthylamin und 0,51 ml (3,84 mMol) Chlorameinsäureäthylester zu, versetzt nach 10 Minuten mit einer vorgekühlten Lösung von 1 g (3,84 mMol) N-Carbobenzoxycyl-N,N'-dimethylhydrazid in 25 ml abs. Chloroform und lässt 1½ Stunden bei Zimmertemperatur stehen. Nach Abdampfen des Chloroforms (am Vacuum) nimmt man den Rückstand in Essigester auf, wäscht mit 2N Citronensäure, 10-proz. Hydrogencarbonatlösung und Wasser, trocknet über Natriumsulfat und engt am Vacuum zur Trockene ein.

Die Rohausbeute beträgt 1,615 g (84,4 %) Oel!!

Das Oel reinigt man durch Alox-Chromatographie.

(Siehe allgemeiner Teil, S. 30)

Säulenfüllung: 50 g Aluminiumoxyd (nach Brockmann-Merck)

Eluiermittel: Chloroform/Isopropanol 10:1 (v/v)

Reinausbeute: 1,5 g (78,3 %) Oel.

5. N-(Carbobenzoxycyl-D,L-phenylalanin)-N,N'-dimethylhydrazid. (16)

Man löst 1,09 g (2,76 mMol) Carbobenzoxycyl-D,L-phenylalanin-cyanmethylester in 50 ml abs. Essig-

ester, fügt 0,25 g (4,14 mMol) sym.-Dimethylhydrazin und 3 Tropfen Eisessig zu, lässt zwei Stunden bei Zimmertemperatur stehen, engt am Vacuum zur Trockene ein, nimmt den Rückstand in Essigester auf, wäscht mit 2N Essigsäure, 2N Natriumhydroxyd, Wasser, trocknet über Natriumsulfat und engt am Vacuum zur Trockene ein.

Man kristallisiert den Rückstand aus Essigester/Petroläther um und erhält ein bei 136-137° schmelzendes kristallines Produkt (0,382 g = 35 %).

Zur Analyse kristallisiert man das Hydrazid aus Essigester/Petroläther um und trocknet bei 75° und 0,02 Torr. 17 Stunden über P₂O₅. Der Schmelzpunkt bleibt dabei unverändert.

C ₂₁ H ₂₆ N ₄ O ₄	ber.:	C 63,30 %	H 6,58 %	N 14,06 %
/398,45/	gef.:	63,28 %	6,63 %	13,93 %

6. Isobutyryl-D,L-phenylalanin. (17)

Man löst 6,6 g (40 mMol) D,L-Phenylalanin in 39,6 ml 1N Natriumhydroxyd, kühlt unter 0° ab, fügt unter starkem Rühren alternierend, in kleinen Portionen 59,4 ml 1N Natriumhydroxyd und 9,3 ml (50 mMol) Isobuttersäureanhydrid während ca. 15-20 Minuten zu. Nun stellt man die Lösung mit konz. Salzsäure kongosauer ein, filtriert den Niederschlag ab und trocknet über P₂O₅ im Exsiccator.

Das Isobutyryl-D,L-phenylalanin kristallisiert man aus Essigester/Petroläther um.

Smp.: 109-110°

Ausbeute: 4,041 g (42,9 %)

Zur Analyse kristallisiert man die Substanz aus

Aether um (Smp.: 110-112°) und trocknet bei 0,05 Torr. und 50° 19 Stunden über P₂O₅.

C ₁₃ H ₁₇ NO ₃	ber.:	C 66,36 %	H 7,28 %	N 5,95 %
/235,27/	gef.:	66,55 %	7,30 %	5,73 %

7. Isobutyryl-D,L-phenylalanin-cyanmethylester. (18)

Man übergiesst 4,04 g (17,15 mMol) Isobutyryl-D,L-phenylalanin mit 3,58 ml (25,7 mMol) Triäthylamin, wobei unter Erwärmung eine viskose Masse entsteht, fügt 3,24 ml (34,3 mMol) Chloracetonitril zu, worauf unter spontaner Erwärmung auf 70° eine gelbe Lösung entsteht.

Nach Abdestillieren des Chloracetonitril-Ueber-schusses nimmt man den Rückstand in Aether auf, wäscht mit viel 2N Salzsäure, 10-proz. Hydrogen-carbonatlösung, Wasser, ges. Kochsalzlösung, trock-net über Natriumsulfat und engt am Vacuum zur Trockene ein.

Nach Umkristallisieren aus Aether erhält man 3,92 g (82,3 %) Cyanmethylester vom Schmelzpunkt 70-71°.

Zur Analyse kristallisiert man die Substanz noch-mals aus Aether um (Smp.: 72-73°) und trocknet bei 55° und 0,005 Torr 16 Stunden über P₂O₅.

C ₁₅ H ₁₈ N ₂ O ₃	ber.:	C 65,67 %	H 6,61 %	N 10,21 %
/262,3/	gef.:	65,72 %	6,71 %	10,38 %

8. Isobutyryl-D,L-phenylalanin-pyrazolidid. (19)

Man löst 0,7211 g (10 mMol) Pyrazolidin und 2,7431 g (11 mMol) Isobutyryl-D,L-phenylalanin-cyanmethylester in 15 ml abs. Essigester, setzt 2 Tropfen Eisessig

zu und lässt bei Zimmertemperatur 2 Stunden stehen. Nach Abfiltrieren des Bodenkörpers kristallisiert man denselben aus Essigester/Petroläther um. Man erhält 0,835 g (28,9 %) Pyrazolidid vom Schmelzpunkt 153-154°. (Es sublimiert teilweise bei 144°.)

9. N-(Carbobenzoxym-D,L-phenylalanyl)-N'-isobutyryl-pyrazolidin. (20)

Man löst 7,21 g (24,1 mMol) Carbobenzoxym-D,L-phenylalanin in 70 ml abs. Chloroform, kühlt auf -10° ab, fügt 3,37 ml (24,1 mMol) Triäthylamin und 2,31 ml (24,1 mMol) Chlorameisensäureäthylester zu, versetzt nach 10 Minuten mit einer vorgekühlten Lösung von 3,44 g (24,1 mMol) ~~Isobuttersäure~~-pyrazolidin in 20 ml abs. Chloroform und lässt 1½ Stunden bei Zimmertemperatur stehen.

Nach Eindampfen am Vacuum zur Trockene nimmt man den Rückstand in Essigester auf, wäscht mit 2N Salzsäure, 10-proz. Hydrogencarbonatlösung, Wasser, trocknet über Natriumsulfat und engt am Vacuum zur Trockene ein.

Den Rückstand kristallisiert man aus Essigester/Petroläther um.

Smp.: 153-155°

Ausbeute: 6,42 g (62,8 %)

VI. Potentiometrische Titration zur Bestimmung von Dissoziationskonstanten.

a.) Durchführung.

Die den im Rahmen dieser Arbeit bestimmten Dissoziationskonstanten (vgl. Tabelle 1, S. 13)

zugrundeliegenden potentiometrischen Titrationskurven wurden mit einem Titriergerät TTT 1 in Kombination mit einem Titrigraphen SBR der Firma Radiometer, Kopenhagen, aufgenommen.

Das für die Messung verwendete Elektrodensystem (Glas- und ges. Kalomelelektrode der Firma Radiometer) wurde mit Pufferlösungen (Radiometer) bei pH $1 \pm 0,02$; pH $3 \pm 0,02$ und pH $6,5 \pm 0,02$ geeicht.

b.) Messergebnisse.

In den nachfolgenden Tabellen kennzeichnen die Buchstaben a, b und c die Ergebnisse verschiedener Titrationen derselben Verbindung.

237,25 mg (1 mmol) N-Carbobenzoxymethylglycin-N-methylhydrazid (1) werden in 20 ml 0,1N Salzsäure gelöst und in einem Messkolben mit CO_2 -freiem Wasser auf 100 ml aufgefüllt. Mantitriert je 10 ml davon.

Verbrauch NaOH $\text{ml} \cdot 10^3$	pH der Lösung		
	a	b	c
125	2,28	2,28	2,30
150	2,48	2,48	2,50
175	2,78	2,78	2,75

237,25 mg (1 mMol) N-Carbobenzox glycine-N'-methylhydrazid (2) werden in 20 ml 0,1N Salzsäure gelöst und in einem Messkolben mit CO₂-freiem Wasser auf 100 ml aufgefüllt. Man titriert jeweils 10 ml davon.

Verbrauch NaOH ml · 10 ³	pH der Lösung		
	a	b	c
125	2,90	2,88	2,88
150	3,20	3,18	3,23
175	3,60	3,63	3,68

c.) Zur Berechnung der Dissoziationskonstanten.

Die Berechnung der Dissoziationskonstanten erfolgte nach der folgenden Gleichung:

$$K'_A = \frac{[H^+][c + H^+ + Na^+ - OH^- - Cl^-]}{[OH^- + Cl^- - H^+ - Na^+]}$$

c = Konzentration der Verbindung

wobei der Zahlenwert von OH⁻ klein ist und vernachlässigt wird.

Für Vergleiche innerhalb der durchgeführten Messreihe kann ein mittlerer Fehler von ±0,05 pK-Einheiten angenommen werden.

Zusammenfassung.

Die Aminoacylierung von am Hydrazin-Stickstoff alkylierten Carbonsäurehydraziden mittels α -Aminosäure-N-carboxyanhydriden kann nicht analog zu derjenigen von unsubstituierten Carbonsäurehydraziden durchgeführt werden, d.h. der glatte Verlauf der Reaktion in Eisessig beschränkt sich auf am Hydrazin-Stickstoff nicht alkylierte Carbonsäurehydrazide.

Bei Carbobenzoxylglycin-N'-methylhydrazid ergibt die Umsetzung mit D,L-Phenylalanin-N-carboxyanhydrid immerhin in einer Ausbeute von 62 % reines, kristallines N-(Carbobenzoxylglycyl)-N'-methyl-N'-(D,L-phenylalanyl)-hydrazin.

Die Reaktion mit Carbobenzoxylglycin-N-methylhydrazid verläuft sehr uneinheitlich, kann aber durch Zusatz einer starken Carbonsäure zum Eisessig (z.B. Halogenessigsäuren) etwas einheitlicher gestaltet werden. So gelingt es, das N-(Carbobenzoxylglycyl)-N-methyl-N'-(D,L-phenylalanyl)-hydrazin-hydrochlorid in einer Ausbeute von 43 % in reiner, kristalliner Form zu erhalten.

Die Umsetzung zwischen D,L-Phenylalanin-N-carboxyanhydrid und Carbobenzoxylglycin-N,N'-dimethylhydrazid bzw. Isobuttersäure-pyrazolidid lieferte auch in Gegenwart von Halogenessigsäuren komplexe Gemische. Das darin enthaltene α -Aminodiacylhydrazin lagert sich aber bereits ohne die katalytische Wirkung von Eisessig in Carbobenzoxylglycyl-D,L-phenylalanin-N,N'-dimethylhydrazid, resp. Isobutyryl-D,L-phenylalanin-pyrazolidid um. Diese Verbindungen konnten aus dem Reaktionsgemisch in Ausbeuten von 61 % bzw. 27 % in kristalliner Form isoliert werden.

Anhand der erhaltenen Resultate ist anzunehmen, dass das N-(Carbobenzoxylglycyl)-N,N'-dimethyl-N'-(D,L-phenylalanyl)-hydrazin in zwei isomeren Formen existiert, die nicht

durch fraktionierte Kristallisation getrennt werden können.

Die Relation der beiden Isomeren zueinander bedarf noch einer näheren Untersuchung.

Curriculum vitae

Am 29. Juli 1938 wurde ich, Otto Erwin Gerle, als Sohn des Eugen J. Gerle, Kaufmann, von Budapest/ Ungarn/ und Ibolya, geb. Reisz in Budapest geboren. Dasselbst besuchte ich die Volksschule und anschliessend das Chemotechnikum, wo ich 1956 die Maturitätsprüfung (Technikerdiplom) bestand.

Dann verbrachte ich die nächsten 5 Monate als Chemotechniker in dem Institut für industrielle Kunststoffforschung in Budapest.

Infolge der ungarischen Revolution flüchtete ich am 7.12.1956 nach Oesterreich. Am 12.12.1956 reiste ich in die Schweiz ein.

Im Sommersemester 1957 immatrikulierte ich mich an der Universität Basel und belegte Chemie als Hauptfach und physikalische Chemie, Mineralogie und Pharmakologie als Nebenfächer. Im November 1958 bestand ich das Nebenfachexamen in Mineralogie, im November 1962 dasjenige in physikalischer Chemie und im März 1964 dasjenige in Pharmakologie. Die Vorexamina in anorganischer Chemie und Farbenchemie bestand ich im November 1959, im Juni 1962 und im Januar 1962. Die vorliegende Doktorarbeit begann ich unter Leitung von Herrn Prof. Dr. M. Brenner im November 1962.

Während meines Studiums besuchte ich Vorlesungen und Praktika folgender Dozenten:

E. Baumgartner, P. Bearth, M. Brenner, K. Bucher,
H. Erlenmeyer, S. Fallab, J. Gantner, C. Grob, F. Grün,
P. Huber, W. Kuhn, A. Marxer, E. Miescher, B. Prijs,
T. Reichstein, E. Salin, H.R. Striebel, Ch. Tamm,
E. Wenk, H. Wirz, R. Wizinger.

